UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1945-1946 — N° 330

PROTEOLYSE ET LIPOPHANÉRÈSE DANS LE SÉRUM SANGUIN

THESE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
MENTION **PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le Mercredi 23 Janvier 1946

PAR

Georges-Michel BUFFE

Pharmacien
Licencié ès Sciences
Pharmacien-Chimiste de la Marine

Né à **Toulon** (Var), le 19 Février 1909

Examinateurs de la Thèse

MM. CHELLE, professeur..... *Président*
CREYX, professeur..... *Juges.*
SIGALAS, professeur..... *Juges.*
MANDOUL, agrégé..... *Juges.*

BORDEAUX
IMPRIMERIE RENÉ SAMIE
21, 23, rue Teulère

1946

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1945-1946 — N° 330

PROTEOLYSE ET LIPOPHANÉRÈSE DANS LE SÉRUM SANGUIN

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
MENTION **PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le Mercredi 23 Janvier 1946

PAR

Georges-Michel BUFFE

Pharmacien
Licencié ès Sciences
Pharmacien-Chimiste de la Marine

Né à **Toulon** (Var), le 19 Février 1909

Examinateurs de la Thèse

MM. CHELLE, professeur..... *Président.*
CREYX, professeur.....
SIGALAS, professeur ..... *Juges.*
MANDOUL, agrégé.....

BORDEAUX
IMPRIMERIE RENÉ SAMIE
21, 23, rue Teulère

1946

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Doyen..... M. DUPÉRIÉ
Assesseur..... M. LABAT

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DENIGÈS, BEILLE, DUPOUY, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ABADIE, ANDERODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES LEURET, PÉRY.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	N.	Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX.
id.	DUPÉRIÉ.	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LOUBAT.
Clinique chirurgicale et gynécologique	N...	Clinique des maladies infectieuses	DAMADE.
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF.
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE.	Physique médicale et pharmaceutique	N.
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY.	Médecine coloniale et clin. des maladies exotiques	BONNIN.
Anatomie	VILLEMIN.	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.	Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET.
Hygiène	N...	Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET.
Médecine légale et déontolog.	DERVILLÉE.	Clinique d'oto-rhino-laryngol.	N.
Electroradiologie et cliniq d'électricité médicale	RÉCHOU.	Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT.
Chimie	CHELLE.	Hydrologie thérapeutique et Climatologie	CREYX.
Botanique et matière médicale	GOLSE.	Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ.
Pharmacie	VITTE.		
Physiologie	FABRE.		
Zoologie et parasitologie	SIGALAS.		
Médecine expérimentale	N...		
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN.		

PERRENS (Maladies mentales), CHARRIER (Chirurgie générale), FAUGÈRE (Obstétrique).

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	DUFOUR.	Obstétrique	N.
Physiologie	FRANCK.	id.	MAHON.
Médecine générale	PIECHAUD.	Ophtalmologie	N...
id.	N.	Oto-Rhino-Laryngologie	DESPONS.
id.	N.	Dermatologie et syphiligraphie	N...
id.	N...	Physique médicale	N...
id.	BROUSTET.	Chimie générale pharmaceutique et toxicologie	CASTAGNOU.
id.	N.	Histoire naturelle pharmaceutique	GIRARD.
id.	SARIC.	Pharmacie	MESNARD.
id.	DUBARRY.	id.	GRANGER.
Chirurgie générale	N.	Histoire naturelle médicale et parasitologie	R. MANDOUL.
id.	MASSÉ.		
id.	N.		
id.	MAGENDIE.		
id.	POUYANNE.		

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	MASSÉ.	Anatomie	J. BEAUVIEUX.
Accouchements	MAHON.	Chimie minérale	CASTAGNOU.
Puériculture	FAUGÈRE.	Botanique	GIRARD.
Zoologie et parasitologie	R. MANDOUL.	Cryptogamie	GIRARD.
Médecine légale	N...	Pharmacie galénique	MESNARD.
Urologie	N...	Bactériologie	MOUREAU.
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.	Physiologie	Mlle ROUGIER.
Ophtalmologie	N...	Chimie biologique	TAYEAU.
Pathologie chirurgicale	J. VILLAR.	Parasitologie, biologie appliq.	PAUTRIZEL.
id.	CHAVANNAZ.		

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

A MA FEMME.

Avec toute ma tendresse.

A MON FILS.

A MON PERE ET A MA MERE.

C'est à vous que je dédie ce travail, vous à qui je dois tout ; qu'il soit l'expression de ma gratitude et de mon amour filial.

A MES BEAUX-PARENTS

Témoignage affectueux.

A MON FRERE.

A MA BELLE-SŒUR.

A MON NEVEU.

A MON ONCLE.

A MA TANTE.

MEIS ET AMICIS.

A MON AMI, LE DOCTEUR E. LE BRETON,

Médecin principal de la Marine,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de Guerre,

Très cordialement.

A MON CHEF,

Monsieur le PHARMACIEN-CHIMISTE GÉNÉRAL MARCELLI,

Officier de la Légion d'honneur,

Très respectueusement.

A Monsieur le Docteur F. TAYEAU,

Chargé de cours de Chimie biologique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,

Chargé de recherches
au Centre National de la Recherche Scientifique,

Docteur ès sciences,

Sans vous, le travail que je présente à mes Juges n'aurait pas été accompli.

Vous en avez été l'inspirateur; votre haute compétence et votre amabilité de tous les instants m'ont permis, malgré les difficultés de toutes sortes que créait l'occupation ennemie de notre pays, de persévérer dans mon effort. Je ne saurais vous dire avec assez de force toute la gratitude et l'admiration que je vous témoigne.

A MES JUGES :

MONSIEUR LE POFESSEUR AGRÉGÉ MANDOUL,

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur,

Je suis heureux qu'un de mes anciens condisciples, aujourd'hui un Maître, ait bien voulu être mon juge. Je l'en remercie. Qu'il veuille accepter avec l'assurance de ma cordiale amitié le témoignage de mon admiration.

MONSIEUR LE PROFESSEUR SIGALAS,

Professeur de Zoologie et Parasitologie
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique,

A l'étudiant, vous avez ouvert votre laboratoire et vous avez permis de travailler auprès de vous, le faisant bénéficier de vos leçons, de vos conseils et de vos encouragements dans les moments difficiles.

Au professeur à l'Ecole de Santé navale, vous avez toujours apporté votre aide dans l'accomplissement de sa tâche. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon respectueux attachement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR CREYX,

Professeur d'Hydrologie thérapeutique et Climatologie
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Médecin des Hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de Guerre,
Officier de l'Instruction publique,

Qui m'a accueilli avec la plus grande bienveillance et qui m'a fait un grand honneur en acceptant de me juger.

Témoignage respectueux.

A mon Maitre et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur CHELLE,

Professeur de Chimie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,

Membre correspondant de l'Académie de Médecine,

Chevalier de la Légion d'honneur,

Officier de l'Instruction publique,

Vous avez été mon Maître, éminent, sympathique et accueillant; aujourd'hui, vous acceptez d'être le Président de mon Jury de thèse; je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites, et je vous prie de croire à toute ma reconnaissance et à mon profond respect.

INTRODUCTION

Dans son remarquable traité de chimie physique, M. Jacques Duclaux (41) consacre une large part au problème des protéides et, dans une rétrospective fort imagée, il rappelle les multiples recherches qu'ont dû effectuer les chimistes pour nous donner une idée sur les molécules complexes que constituent ces substances.

Après avoir signalé les premières recherches sur l'huile de Dippel et sur la distillation sèche (Beccari, 1745; Rouelle, 1773; Berzelius, 1883), il rappelle les magnifiques travaux de Green (1809), de Dumas et Cahours, puis de Schutzenberger, qui permirent de classer les protéides parmi les principes immédiats de la matière vivante. Puis il évoque les premiers travaux sur l'isolement des aminoacides qui conduisirent les chercheurs à distinguer les divers protéides par leur composition (Fischer).

C'est alors que les notions de physico-chimie sont venues compléter ces premiers résultats. Le problème des protéides entra dans une phase nouvelle (Sœrensen, Hardy, Lœb, Michaelis, Cohn, Tiselius) et, à ce moment, apparurent les notions de *p*H isoélectrique, de pression de Starling, de poids moléculaire, etc...

De nombreuses recherches physico-chimiques sont encore en cours, mais déjà ce stade est dépassé, et les problèmes de l'architecture des protéides, de leur réactivité, de la

détermination des fonctions dont leurs molécules sont hérissées passionnent particulièrement les chercheurs.

Pour résoudre ces problèmes, de nombreuses techniques ont été mises en jeu (spectres de diffraction de rayons X, lames minces, réactions immunologiques, protéolyse enzymatique...). Parmi toutes ces techniques, la protéolyse enzymatique « fractionnée » a permis d'obtenir des résultats fort intéressants. Utilisée il y a quelques années pour la constitution du glutathion, dont on a pu ainsi déterminer la structure exacte, elle a été appliquée aux protéides et en particulier aux protamines extraites des laitances de poissons; on sait, par exemple, comment se succèdent dans la molécule de clupéine les différents radicaux d'aminoacides (Linderström-Lang, Félix et Mager, Bergmann).

Grâce à toutes ces techniques modernes et aux efforts des chercheurs, on est parvenu aujourd'hui à posséder quelques notions sur la structure des protéides.

Mais, dans la matière vivante, les protéides qui constituent un des éléments fondamentaux du cytoplasme se trouvent rarement à l'état libre. Ils sont, le plus souvent, fixés à d'autres substances pour former des complexes qui rendent plus difficile encore l'étude de la matière vivante (cénapses lipido-protéidiques de Machebœuf, polycomposants de Przylecki). L'étude de ces complexes et le mode d'union entre leurs constituants ont déjà fait l'objet d'un certain nombre de recherches, dont nous aurons l'occasion de parler dans notre travail. Un grand nombre de ces recherches a été effectué sur le sérum sanguin, riche en cénapses lipidoprotéidiques, et des hypothèses ont été émises sur la nature des liaisons unissant les lipides et les protéides. Aussi, lorsque sur une cellule vivante on fait agir un enzyme protéolytique, non seulement on hydrolyse les protéides, mais encore on provoque la lipophanérèse; l'architecture protéidique étant détruite, les lipides se trouvent libérés. C'est l'expérience que réalisèrent jadis Miescher

(144), Biederman (14), puis Ciaccio (28). A la suite de cette constatation, on pouvait se demander si une protéolyse fractionnée des protéides, effectuée à l'aide d'enzymes dont on connaît la spécificité d'action, et une étude de la lipophanérèse provoquée ne seraient pas susceptibles de nous apporter des arguments intéressants sur le mode d'union entre les divers constituants des cénapses contenues dans le sérum sanguin.

Une telle étude avait déjà été abordée en 1934 par Sandor et Delage (193), qui avaient signalé la difficulté de l'entreprise, « le comportement du sérum étant foncièrement différent de celui d'autres tissus comme le tissu musculaire, pour lesquels la pepsine est capable d'opérer la lipophanérèse ».

Sandor et Delage n'avaient effectué que quelques essais préliminaires (rapportés dans la thèse de Sandor) ; les auteurs n'indiquent d'ailleurs pas dans leurs expériences l'évolution de la protéolyse. Aussi, il est fort probable que ce comportement particulier du sérum, auquel ils font allusion, est simplement dû à l'existence dans le sang d'antienzymes, sur lesquels nous aurons l'occasion de nous étendre.

En opérant dans certaines conditions, le rôle joué par ces antienzymes peut être partiellement contrarié.

Nous avons donc repris, dans des conditions que nous préciserons plus loin, l'étude de la lyse des protéides sériques. Nous avons étudié en même temps la lipophanérèse provoquée par cette protéolyse.

Enfin, une étude détaillée des protéides sériques et des lipides qui les accompagnent après protéolyse enzymatique puis chimique, nous a permis de préciser le mode d'attaque des divers agents protéolytiques.

Nous espérons que les résultats apportés dans ce travail, qui constitue le prélude d'une série de recherches, momentanément abandonnées à la suite d'une récente affectation,

permettront non seulement d'envisager l'étude de la digestion « in vivo » des cénapses lipidoprotéidiques et de leurs transformations au cours de leur passage dans le tractus digestif, mais encore de reprendre l'importante question de la digestion des lipides qui fait aujourd'hui l'objet de si nombreuses controverses.

Dans notre thèse, nous consacrons une large part aux diverses fractions protéidiques du sérum ainsi qu'aux cénapses lipidoprotéidiques, auxquelles nous devrons souvent faire allusion.

Aussi, est-ce par une étude historique sur ces sujets que nous aborderons notre travail.

Nous donnerons ensuite quelques précisions sur les enzymes que nous avons utilisés et sur leur mode d'action, puis, après quelques détails sur les techniques mises en jeu, nous exposerons nos expériences et les résultats auxquels elles nous ont conduit.

PREMIERE PARTIE

ÉTUDE HISTORIQUE

Chapitre Premier

Les protéides du sérum sanguin

Le sérum sanguin des divers mammifères contient 70 à 80 g. de protéides par litre.

Depuis bien longtemps, on a cherché à fractionner ces protéides et il semble que c'est à Panum (155) que revient le mérite d'avoir, pour la première fois, distingué dans le sérum deux grandes variétés :

1° La « *sérum caséine* », appelée *globuline* par la suite, qui précipite quand le sérum est dilué;

2° « *L'albumine* », qui ne précipite pas dans ces conditions.

Cette technique, qui a subi quelques modifications (200-244-103), a fini, à la suite des remarques d'Hammarsten (75), par être complètement abandonnée.

Denis (36), peu de temps après Panum, propose de

fractionner les protéides sériques à l'aide des sels minéraux, et il utilise à cet effet le sulfate de magnésium. En saturant le sérum à l'aide de ce sel, il isole une fraction qui précipite et à laquelle il donne le nom de « *fibrine dissoute* » (voisine des globulines), tandis qu'il réserve le nom de « *sérine* » (correspondant à l'albumine) à la fraction qui n'a pas précipité. Cette technique est encore utilisée de nos jours (230).

Le sulfate de sodium a été aussi employé (86-161-21-98) et, en l'utilisant, Howe (88) a particulièrement bien décrit une méthode de séparation des albumines et des globulines. Le sulfate d'ammonium reste, dans la séparation des protéides sériques, le plus utilisé. Proposé depuis longtemps par Michaïlow (143), Kauder (96) et Pohl (164), il a fait l'objet des très intéressantes recherches d'Hofmeister (83-84-85), qui méritent d'être quelque peu détaillées.

Hofmeister a, en effet, remarqué que si, petit à petit, on fait dissoudre dans du sérum sanguin du sulfate d'ammonium pulvérisé, il se forme un précipité allant en augmentant jusqu'à ce que la concentration en sulfate d'ammonium atteigne un taux voisin de la demi-saturation. A ce moment, il faut augmenter nettement la concentration saline pour que la précipitation d'une nouvelle fraction protéidique apparaisse. Si l'on trace la courbe représentative des variations du poids de protéides précipités en fonction de la quantité de sulfate d'ammonium ajoutée au sérum, on constate que cette courbe présente un palier qui sépare deux fractions protéidiques. A la première de ces fractions, on a donné le nom de « *sérum globuline* »; à la deuxième, celui de « *sérum albumine* ».

D'autres sels ont encore été préconisés pour la séparation des protéides sériques; contentons-nous de les mentionner : le citrate de potassium (Jameson et Roberts, 91); le chlorure de sodium (Schmidt, 200); l'acétate de sodium (Lewith, 110); le phosphate de potassium (Butler et Mont-

gomery, 20) ; le sulfate de cuivre (Kalcheva, 95) ; le sulfite de sodium (Campbell et Hanna, 21).

Enfin, les substances les plus variées ont été employées. L'acétone, utilisée dans certaines conditions, a permis à Piettre et Vila (160) de séparer dans le sérum les albumines et les globulines.

Cette technique a d'ailleurs conservé de nombreux partisans (3-4-16-17-203-35).

Citons encore l'utilisation de l'alcool (Tebb, 228), du fer colloïdal (Lunde et Wulfert, 115), du tannin (Lundin et Schrôderheim (116), de l'ultrafiltration (Grabar, 67), des lames minces (Gorter et Blokfer, 66), etc..., dans le fractionnement des protéides sériques (1).

Toutes ces techniques mettant en jeu les réactifs les plus divers permettent donc d'extraire du sérum sanguin deux grandes fractions protéidiques, les *globulines* et les *albumines.*

Les fractions obtenues par ces diverses méthodes sont-elles identiques ? Evidemment non, et cela a été signalé depuis bien longtemps par Rollet (186), Lambling (105), Dulière (42), Thiodet et Ribère (231), Machebœuf, Tayeau et Battut (130), Tayeau et Martin (226). Les fractions obtenues par ces diverses techniques et portant les noms « *globulines* » et « *albumines* » sont extrêmement différentes, et « tant qu'une entente ne sera pas réalisée pour la définition des termes « *globulines* » et « *albumines* », il ne faut pas les utiliser sans préciser les détails de la technique qui a servi à obtenir la fraction protéidique que l'on envisage (130) ».

Parmi toutes ces méthodes, c'est celle d'Hofmeister qui prévaut aujourd'hui, et lorsque, pratiquement, on utilise le terme de *globuline*, il s'agit de la fraction précipitée par addition au sérum d'un égal volume de solution satu-

(1) Dans la thèse de M^lle^ Martin (136), on trouvera une description des principales méthodes de fractionnement des protéides sériques.

rée de sulfate d'ammonium (*p*H 7) ; quant au terme d'*albumine*, il correspond à la fraction restée soluble dans ces conditions.

Les deux fractions ainsi obtenues sont-elles homogènes ? C'est la question que de nombreux chercheurs se sont posée.

En mettant en jeu l'ultracentrifugation (Mac Farlane, 117), l'électrophorèse (Tiselius, 233-234), la pression osmotique (Hewitt, 82), le poids moléculaire (M^me^ Roche, Dorier et Samuel, 182), la solubilité (Pérez, 157) et le point isoionique (Tayeau et M^lle^ Martin, 227), il a été démontré que les deux fractions obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium demi-saturé étaient hétérogènes.

Dans un récent travail, M^lle^ Martin (136) a précisé le degré d'hétérogénéité de ces fractions (1).

Concluons donc, avec M^me^ Roche (178), en disant que « le rapport albumine/globuline, qui est habituellement utilisé en clinique, ne saurait alors avoir d'autre signification que celle d'un indice (2) ».

---

(1) Signalons que l'on est parvenu à obtenir des fractions beaucoup moins hétérogènes en opérant à une certaine dilution et à un *p*H déterminé (M^me^ Roche, Samuel et Arthaud, 184).

(2) Notons que de nombreux travaux ont été effectués sur le fractionnement des globulines et des albumines. C'est ainsi que l'on appelle « euglobulines » les globulines insolubles dans l'eau pure, et « pseudoglobulines » celles qui restent dissoutes dans ces conditions (Marcus, 134). La dialyse contre de l'eau distillée permet donc la séparation de ces deux fractions (Quinnan, 173).

La dialyse étant une opération assez longue, certains auteurs (Fuld et Spiro, 58; Porges et Spiro, 169) ont préconisé le fractionnement des globulines à l'aide du sulfate d'ammonium, mais les « euglobulines » et les « pseudoglobulines » ainsi obtenues ne sont pas identiques à celles de Marcus (Freund et Joachim, 55; Ettisch et Sachsse, 46; Tayeau et Martin, 226).

Notons encore que ces deux fractions ne sont pas absolument différenciées; ce fait, qui avait été prévu jadis par de nombreux auteurs (Samuely, 192; Hardy, 77; Handowski et Wagner, 76; Haslam, 79; Chick, 25; Hartley, 78; Went et Farago, 242; Went et Goreczky, 243; Pirosky et Modern, 162) fut démontré par la suite; l'insolubilité dans l'eau pure des euglobulines est simplement due aux lipides (Machebœuf et Tayeau, 129) ou plus exactement aux phosphatides (Tayeau, 224) qui leur sont liés.

Néanmoins, cette séparation des globulines en euglobulines et en pseudo-

En utilisant des techniques précises (précipitation fractionnée, cristallisation, électrophorèse), on est parvenu à préparer des fractions très homogènes; on a pu ainsi déterminer les constantes physico-chimiques des albumines et des globulines et établir une comparaison entre ces deux grandes fractions.

Au début, on a cherché (74-133-202-146-158-8-141-69-81) à différencier ces deux fractions par l'analyse élémentaire, mais les résultats obtenus furent peu sélectifs.

Le dosage des aminoacides (1-2-80-97-71-59-153-52) fut plus intéressant et montra des différences appréciables, notamment en ce qui concerne la teneur en cystine (1,5 p. 100 dans les globulines, 2,3 p. 100 dans les albumines) et en proline (2,8 p. 100 dans les globulines, 1 p. 100 dans les albumines).

Le poids moléculaire montra mieux encore cette différence; les chiffres obtenus mettant en jeu soit la pression osmotique (5-179-180-183-181-19 bis), soit la tension superficielle (23), soit l'ultracentrifugation (212-149-150) concordent à peu près et montrent que l'on peut adopter pour la sérum globuline le chiffre de 150.000 et pour la sérum albumine, celui de 75.000 (1).

Enfin le point isoionique (194-234) de ces deux frac-

---

globulines présente un certain intérêt, car dans les immunsérums les anticorps se trouvent dans l'une de ces fractions, le plus souvent dans la seconde.

Le fractionnement des albumines a été également tenté. Rappelons simplement pour mémoire les recherches d'Halliburton (72) (mettant en jeu les températures de coagulation), critiquées par Freund et Lustig (56), puis par Sœrensen (210), celles de Blankenstein et Fischer (15), d'Oppenheimer (154), de Doerr et Berger (38), de Sœrensen (206), de Goldschmidt et Kahn (64), de Butler et Montgomery (20), de Cohn (29), de Roche, Derrien et Mandel (37). Signalons qu'à la lumière des recherches de Machebœuf et de ses collaborateurs (Sandor, Bonnefoi et Pérez, 196; Sandor, Bonnefoi et Goret, 195; Duboy, 123-40), il apparaît que les diverses fractions albuminiques se différencient surtout par la nature des lipides fixés aux protéides.

(1) Pour plus de détails, voir un travail de Tayeau (222).

tions est très différent : compris entre 5,8 et 6,0 pour les globulines, il est situé entre 5,10 et 5,14 pour les albumines.

Concluons donc que la séparation pratique des deux grandes fractions protéidiques du sérum sanguin reste complexe et, faute de mieux, contentons-nous pour le moment de désigner par le terme « *globulines* » les protéides qui précipitent par addition au sérum d'un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammonium neutralisée et par le terme « *albumines* » les protéides qui restent dissous dans ces conditions.

Chapitre II

État des protéides et des lipides dans le sérum sanguin

Théories sur le mode d'union entre protéides et lipides.

Hoppe-Seyler (87) a noté jadis que si l'on agite du sérum avec de l'éther, ce solvant n'extrait pratiquement pas de lipides.

Cette expérience permet donc de conclure que, dans le sérum sanguin, les lipides se trouvent dans un état très particulier les masquant à leurs réactifs habituels.

De très nombreuses recherches ont été effectuées pour expliquer ce comportement si spécial des lipides (1).

Cependant, les vieilles constatations de Miescher (144), puis de Biedermann (14) et enfin de Ciaccio (28) ont permis d'ouvrir la voie à cet important problème.

Miescher avait, en effet, constaté que du pus, soumis à l'action d'une protéase, laissait apparaître des gouttelettes de graisses. Le phénomène fut bien étudié par Biedermann.

Un peu plus tard, Ciaccio (28) signala que, par action d'un enzyme protéolytique sur le cytoplasme cellulaire, on

(1) Voir à ce sujet une monographie de Machebœuf (121).

voyait apparaître des lipides colorables au Soudan III, alors que préalablement rien de semblable ne se produisait.

Donc, pour voir apparaître « à l'état normal » les lipides, il fallait détruire les protéides. Tout laissait donc supposer l'existence de complexes lipido-protéidiques prévus d'ailleurs depuis longtemps non seulement dans le cytoplasme (49-175-31-213-14-109-11-156), mais encore dans le sérum sanguin (77-79-25-78).

On sait d'ailleurs que, dans le sérum, on ne peut extraire les lipides qu'en détruisant les protéides (Kumagawa et Suto, 104).

Les protéides semblaient donc bien être responsables du maintien des lipides en phase aqueuse et l'existence de complexes lipidoprotéidiques paraissait probable.

Les cénapses lipidoprotéidiques.

Mais, pour que cette existence probable devînt une réalité, il fallait isoler de tels complexes. En 1928, Machebœuf (120) réussit cet isolement. Cet auteur prépara, en effet, à partir des albumines sériques, une fraction parfaitement soluble dans l'eau et contenant près de la moitié de son poids de lipides. Quels que soient les traitements auxquels on soumettait cette fraction, sa composition restait rigoureusement constante. De tels complexes ont été désignés par Machebœuf (121) sous le nom de *cénapses lipidoprotéidiques.*

Mais quelle était donc la nature des liaisons qui, dans le sérum, unissent les lipides et les protéides ? Bien des auteurs, alors que l'existence des cénapses était encore hypothétique, croyaient à une liaison chimique (Dormeyer, 39; Erlandsen, 45; Troensgaard et Koudahl, 235; Liebermann, 112; Willstätter et Rohdewald, 246), mais d'autres (Young, 250; Bruger, 18; Sœrensen, 207-208) infirmèrent cette conception.

C'est alors que les recherches effectuées par Machebœuf et ses élèves firent entrer le problème des complexes lipido-protéidiques dans une phase nouvelle.

Mais, pour bien comprendre ces recherches, il ne nous semble pas superflu de rappeler en quelques mots les notions que nous possédons aujourd'hui sur l'architecture des protéides.

La molécule protéidique comporterait un certain nombre de constituants élémentaires (Sœrensen). Chacun de ces constituants formerait une longue chaîne polypeptidique constituée par des aminoacides. Autour de cette chaîne existeraient diverses fonctions provenant de restes d'aminoacides (—COOH d'acides aspartique et glutamique, —NH^2 d'ornithine, de lysine, d'arginine, de citrulline, —OH de sérine, de thréonine, de tyrosine, —SH de cystéine, —S— de méthionine, —C^6H^5 de phénylalanine, —CH^3 —CH^2— de valine, leucine, etc...).

La chaîne elle-même aurait, suivant la nature du protéide envisagé, les formes les plus variées : dicétopipérazine (Abder-Halden, 2) ; zig-zag (Astbury, 6) ; cyclols (Wrinch, 247).

Donc, en résumé, un protéide peut être considéré comme une énorme molécule, dont la forme est plus ou moins bien connue, mais dont la surface est hérissée de fonctions diverses qui commandent la réactivité du protéide.

Théorie de Machebœuf et Sandor.

Etudiant l'action de l'éther additionné de faibles quantités d'alcool sur le sérum, Machebœuf et Sandor (125-126) ont obtenu des résultats fort intéressants qui leur ont permis d'échafauder l'hypothèse suivante (1) :

Dans certaines cénapses lipidoprotéidiques du sérum, les

(1) On trouvera un résumé de ces travaux dans un travail de Tayeau (222).

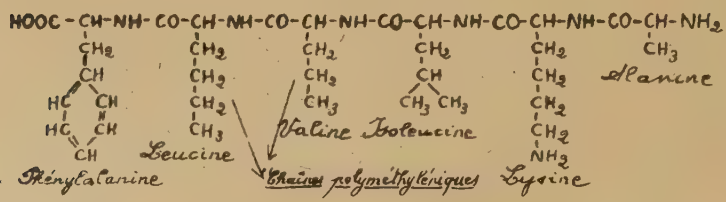
lipides et les protéides seraient unis entre eux grâce à l'affinité réciproque que présentent leurs chaînes polyméthyléniques homologues, tandis que les fonctions hydrophiles des protéides seraient orientées vers l'eau. Autour de cet ensemble se trouverait une zone d'influence réciproque « eau - fonctions hydrophiles », et ce sont les molécules d'eau entourant cet ensemble qui formeraient la zone si difficilement pénétrable à l'éther et en général aux réactifs non hydrophiles des lipides (2).

L'hypothèse de Machebœuf et Sandor fut confirmée quelques années plus tard par les recherches de Machebœuf et Tayeau (127-128).

Si, en effet, les lipides et les protéides sont unis comme le pensent Machebœuf et Sandor, on doit pouvoir détacher les lipides liés aux protéides en faisant arriver au contact de ces derniers et en masse suffisante d'autres substances également polyméthyléniques et hydrosolubles (afin que leur contact avec les protéides dans le sérum soit intime). Les auteurs ont utilisé à cet effet les savons alcalins qui, ajoutés au sérum en quantité convenable, permettent à l'éther d'extraire une très abondante quantité de substances lipoïdiques (glycérides, phosphatides, stérides et sté-

---

(2) La figure ci-dessous, empruntée à un travail de Tayeau (222), montre les chaînes polyméthyléniques que l'on trouve dans les protéides et auxquelles il est fait allusion dans la théorie de Machebœuf et Sandor:



Quant aux chaînes polyméthyléniques des lipides, elles sont constituées, soit par les chaînes des acides gras, soit par la chaîne latérale du cholestérol.

rols). Ils constatent de plus que le savon s'est fixé aux protéides à la place des lipides chassés en formant de nouvelles cénapses protéides-savons. L'étude de toutes les modalités du phénomène (214-215-216) a permis à Tayeau d'apporter de nouvelles confirmations à la théorie de Machebœuf et Sandor.

Nouvelles conceptions de Tayeau sur le système lipidoprotéidique du sérum.

Les savons et l'éther ne détruisent pas toutes les cénapses lipidoprotéidiques; il en est, en effet, qui résistent à l'action des savons et de l'éther, en particulier celles qui entrent dans la constitution des cénapses acidoprécipitables (214). En particulier, une importante portion du cholestérol reste solidement fixée aux protéides. Pour ces cénapses, il fallait envisager d'autres types de liaisons.

Etudiant l'action de l'éther en présence de saponosides (ceux dont l'aglycone possède un cycle cyclopenténophénanthrénique) sur le sérum sanguin, Tayeau (217) remarque que, dans ces conditions, le solvant peut extraire la totalité du cholestérol sérique (1), tandis qu'il n'extrait pas du tout les phosphatides qui restent intimement fixés aux protéides (223).

Cette constatation permet à l'auteur de supposer que si, dans les cénapses lipidoprotéidiques du sérum, les phosphatides sont unis aux protéides grâce à la solvatation réciproque que présentent leurs chaînes polyméthyléniques homologues (conception de Machebœuf et Sandor), le cholestérol doit être uni non pas seulement aux protéides, mais encore aux phosphatides par des forces du type Van der Waals.

Peut-être même, pensons-nous, les phosphatides pour-

(1) Cette constatation a permis à Tayeau de mettre au point une nouvelle méthode pour le dosage du cholestérol sérique (220-221).

raient être le trait d'union entre protéides et cholestérol.

« On expliquerait ainsi les raisons pour lesquelles l'enlèvement des phosphatides provoquerait automatiquement le départ du cholestérol. On comprendrait également que le décollement du cholestérol pût s'effectuer sans que les phosphatides soient « détachés » des protéides (222) (1). »

Résumons donc cette brève étude sur les protéides du sérum sanguin en concluant que les protéides sont formés de constituants élémentaires plus simples, l'ensemble formant une architecture complexe. Sur cet ensemble se trouvent de nombreuses fonctions provenant de restes des aminoacides constitutifs. On y trouve également des chaînes polyméthyléniques et des cycles, qui pourraient même être formés par l'association de certains aminoacides (Fischer, Abder-Halden, 1; Karrer, Wrinch, 247), sur lesquels se trouveraient fixés les lipides et le cholestérol.

On conçoit donc très bien qu'une étude systématique de la protéolyse enzymatique sur le sérum sanguin soit susceptible non seulement de nous fournir des renseignements sur les fractions le plus rapidement attaquées, mais encore de nous éclairer sur la constitution des cénapses.

Il est, en effet, intéressant de savoir si la destruction partielle de l'architecture protéidique provoque l'apparition des lipides, masqués jusqu'alors à leurs réactifs habituels (lipophanérèse).

Nous avons effectué cette étude, et les résultats obtenus font l'objet de la présente thèse. Mais, avant d'exposer nos recherches, nous donnerons quelques renseignements sur les enzymes que nous avons utilisés et sur leur action vis-à-vis des protéides sériques.

---

(1) Notons que, dans les cénapses acidoprécipitables, les phosphatides, bien que résistant à l'action des savons et de l'éther (214), sont également unis aux protéides par des liaisons physiques (Tayeau, 225) et non par des liaisons électrovalencielles comme on l'avait cru.

Chapitre III

La Protéolyse

La lyse des protéides peut être effectuée de différentes façons :

Tout d'abord par voie chimique, mais cette technique, qui permet la libération des aminoacides, a l'inconvénient d'être violente et de provoquer des coagulations qui modifient considérablement l'architecture protéidique.

On peut encore effectuer la lyse par action des bactéries. A une température convenable, celles-ci secrètent des enzymes qui, aidés par ceux de l'autolyse, provoquent la décomposition des protéides, mais cette décomposition dépasse le stade aminoacide. Aussi est-il extrêmement difficile de tirer des conclusions théoriques concernant le mode d'action exact des bactéries sur les protéides.

Enfin, il existe la protéolyse enzymatique. Les protéases attaquent, en effet, les protéides à une température à laquelle ces derniers peuvent résister sans trop modifier leur architecture.

Les protéases que nous avons utilisées sont la pepsine, la trypsine et la papaïne.

Ces enzymes ont une action spécifique assez bien déterminée.

Protéolyse chimique.

La protéolyse chimique acide, dont la mise au point est due à Fischer, permet d'obtenir des renseignements importants sur les aminoacides entrant dans la constitution d'un protéide (168). Les protéides sont traités par l'acide sulfurique à 25 p. 100 (9) ou par l'acide chlorhydrique pur ou additionné de chlorure de zinc, soit par l'acide fluorhydrique (Hougenencq et Morel).

L'hydrolyse doit se passer à l'ébullition et durer de longues heures si l'on veut qu'elle soit totale.

En utilisant cette méthode d'hydrolyse, on obtient les acides aminés constituant les protéides.

Appliquée aux protéides sériques, cette méthode ne permet pas l'étude de la lipophanérèse, les substances lipoïdiques étant détruites.

L'hydrolyse alcaline, effectuée avec la lessive de soude à 25 p. 100, permet d'obtenir une lyse assez avancée des protéides. Certains acides aminés libérés sont, dans ces conditions, décomposés (63), mais la cholestérophanérèse peut être étudiée, le cholestérol résistant aux alcalis.

Les autres substances lipoïdiques (glycérides, phosphatides) sont, dans ces conditions, hydrolysées puis décomposées.

Protéolyse au cours de la putréfaction.

Le sérum sanguin est facilement attaqué par les bactéries de la putréfaction, qui provoquent de nombreuses transformations physico-chimiques (92). Il se produit à la longue une protéolyse appréciable.

Protéolyse enzymatique.

La protéolyse enzymatique a donné les meilleurs résultats lorsqu'il s'est agi d'établir une constitution physico-chimique. Elle présente l'avantage, grâce à son action spécifique, de ne pas agir sur les substances non protéidiques comme les lipides.

Pour l'étude de la lipophanérèse, elle représente la méthode de choix. Comme nous l'avons signalé antérieurement, elle a été appliquée jadis par Miescher (144), Biedermann (14) et Ciaccio (28) à la cellule vivante.

Cependant, son application au sérum sanguin plusieurs fois abordée (Sandor et Delage, 193; Tayeau et J. Chelle, travail inédit), a dû être abandonnée, les protéides sériques résistant à l'action des protéases.

Ceci est dû en partie à l'existence dans le sérum d'anti-enzymes sur lesquels nous donnerons quelques renseignements.

Nous étudierons successivement la pepsine, la trypsine, la papaïne et les antienzymes qui leur correspondent.

Pepsine et antipepsine

La pepsine ou peptase constitue la substance active du suc gastrique. Connue jadis, par Réaumur et Spallanzani, elle a fait l'objet de très nombreux travaux (1).

La pepsine en paillettes que nous avons utilisée dans nos expériences est obtenue en étendant au pinceau une solution de pepsine sur des plaques de verre ou en l'évaporant sur une faible épaisseur. La pepsine ainsi préparée est soluble dans l'eau et dans l'alcool faible; elle est insoluble dans l'alcool à 95°.

La pepsine ne produit la protéolyse qu'en milieu acide.

(1) Pour plus de détails, voir Effront (44), Astruc (7), Goris et Liot (65) et surtout Javillier (93).

L'acide chlorhydrique (à la dose de 1,5 à 3 p. 1.000) semble le plus favorable. Son optimum d'action est voisin de 37° et, dès 58°, la pepsine a perdu une grande part de son activité.

La pepsine transforme donc les protéides en molécules plus petites, les protéoses.

Jadis, on distinguait, parmi les protéoses, la synthonine (ou acidalbumine ou parapeptone), les albumoses (avec les hétéroalbumoses et les protoalbumoses) et les peptones suivant leur degré de solubilité dans certaines solutions salines, mais, ce degré de solubilité n'étant pas un critère de la grosseur moléculaire, cette distinction est aujourd'hui abandonnée. On croyait encore, il y a quelques années, que la pepsine n'attaquait pas les liaisons peptidiques et que, dans un protéide, elle détruisait les autres types de liaisons, comme les liaisons esters formées par action de fonction acide libre d'aminoacides di-acides sur des fonctions alcool de sérine ou de thréonine.

On a même pensé que les protéoses devaient être considérées comme les constituants élémentaires des protéides.

On sait aujourd'hui qu'il n'en est rien et que la pepsine agit sur les liaisons peptidiques (Bergmann et Frutton).

Il est facile de mettre en évidence l'action de la pepsine; il suffit pour cela de placer dans un tube de la fibrine sèche au 1/30e, d'ajouter 2 p. 100 d'acide chlorhydrique dilué du Codex, 2 p. 1.000 de pepsine et, après avoir mélangé, de placer le tube à l'étuve à 50°. Après quelques heures (six environ), on constatera que la fibrine s'est entièrement dissoute.

Sur les protéides sériques, l'action de la pepsine est très limitée. Ceci est dû à l'existence dans le sérum d'une antipepsine.

Il semble que c'est Schnappauf (201) qui a signalé le premier l'existence de cette antipepsine, qui, par la suite,

a fait l'objet d'importantes études (Jacoby, 90; Morgenroth, 148).

Cet antienzyme peut être aisément dosé grâce à l'action empêchante du sérum sur la protéolyse peptasique de la fibrine (Zunz, 251; puis, Oguro, 152).

L'action de l'antipepsine sérique peut être renforcée selon Hamburger (73), si la température s'élève. Cette constatation, confirmée à plusieurs reprises par Rubinstein (189-190), est infirmée par Linossier (114).

Le *p*H jouerait aussi un grand rôle dans l'action de cet antienzyme qui, marquée en milieu neutre, serait très diminuée (Rubinstein, 189) et même annihilée (Cantacuzène et Jonescu-Mihailsti, 22) en milieu acide (1).

Enfin, l'antipepsine est coagulable par l'alcool (Rubinstein, 189).

Tous ces faits laissent supposer la nature protéidique de l'antienzyme, susceptible cependant de dialyser partiellement sans perdre son activité (Rubinstein, 190).

L'antipepsine n'existe pas seulement dans le sang; on l'a trouvée dans d'autres tissus et en particulier dans le foie (Slive, 204).

Trypsine et antitrypsine

La trypsine ou tryptase est extrêmement répandue dans le monde animal. Elle est préparée à partir de la pancréatine provenant de l'extrait de pancréas préparé à froid et desséché.

La trypsine en paillettes que nous avons utilisée est obtenue par un procédé identique à celui décrit pour la pepsine.

La trypsine agit particulièrement bien à une température comprise entre 35° et 40°. Vers 65°, son action diminue

(1) Ce fait est important, la pepsine ayant son maximum d'action en milieu acide.

notablement. Elle agit en milieu neutre ou faiblement alcalin. Elle est soluble dans l'eau.

La trypsine transforme les protéides ou les protéoses en polypeptides en arrachant à leur molécule certains aminoacides bien déterminés (tyrosine, tryptophane, histidine. cystéine, leucine...).

On peut facilement mettre en évidence l'activité de la trypsine en opérant de la façon suivante : dans un récipient, on place de la fibrine au 1/30^{e} et on ajoute 2 p. 1.000 de trypsine. Le récipient est mis à l'étuve à 40°. Après quelques heures (six), la fibrine s'est bien dissoute. Par un dosage des groupements —NH^2, on peut mettre facilement en évidence la protéolyse.

Sur le sérum, l'action de la trypsine est délicate à mettre en évidence, d'abord parce que cet enzyme agit mal sur les protéides non coagulés (60), mais surtout à cause de l'existence dans le sérum d'une antitrypsine, dont la découverte semble revenir à Fermi et Pernossi (50). Cette antitrypsine a fait l'objet de nombreuses recherches (106-99) ; elle peut être aisément dosée grâce à son action empêchante sur la protéolyse trypsique de divers protéides (Marcus, 135; Launoy, 106; Ljubowzow, Montani, 147; Wunderly, 248).

Les conditions (température, *p*H) dans lesquelles agit l'antitrypsine ont fait l'objet d'intéressants travaux (Weinberg et Rubinstein, 241; Schaeffer, 198; Cornelli, 30; Hussey et Northrop, 89; Chrometzka et Knoke, 27; Giedroye, Janicki et Cichoka, 60) (1).

On a beaucoup discuté sur le mode d'action de l'anti-

(1) Signalons que la teneur en antitrypsine du sang varie avec les espèces (Guido Finzi, 70) et dans certains états pathologiques, notamment dans les néoplasmes (Girault et Rubinstein, 61). On ne saurait tirer de cette dernière constatation aucun élément de diagnostic (Effront, 44).

Notons encore que le pouvoir antitrypsique du sérum d'un individu varie au cours de la journée (Glaesner, 62).

trypsine (Meyer, 142; Dastre et Delezenne, Eagle et Harris, 43; Mellanby et Pratt, 140). Nous aurons l'occasion de revenir sur cette question au cours de notre étude expérimentale.

L'antitrypsine perd ses propriétés à la chaleur (Banting et Gairns, 10) ; de plus, elle ne dialyse pas (Weinberg et Rubinstein, 241) ; il s'agit donc bien d'un antienzyme (Chiaki Sako et Mangoro Inabe, 24) ; ce point de vue, cependant, n'est pas admis par tous (Chrometzka, 26).

Papaïne et antipapaïne

La papaïne, encore appelée papayotine, est un ferment protéolytique découvert par Wurtz en 1879 et extrait du *Carica Papaya L.*

Notons que l'on connaît d'autres plantes contenant de la papaïne (figuier, agave, penicillium, aspergillus, etc...). Dans nos expériences, nous avons utilisé une papaïne en poudre, extraite du suc de Carica Papaya à l'aide de la précipitation par l'alcool. Le produit ainsi obtenu est très soluble dans l'eau.

On a pu, dans la papaïne, séparer deux peptidases (Bergmann, 12) et une désaminase (Damodaran et Ananta-Naryavan, 32).

L'optimum de température de l'activité protéolytique se trouve aux environs de 90°, mais à cette température la destruction du ferment est très rapide. A la température ordinaire, la papaïne reste sans action (Delezenne, Mouton et Pozerski, 33-34).

En pratique, et pour des actions un peu prolongées, on a intérêt à se placer à 50° environ (Effront, 44).

On a beaucoup discuté sur le *p*H optimum de la papaïne ; selon certains, il est acide (Hirschler, Ostwald, Dott) ; selon d'autres, il serait alcalin (Martin, Davis, Rideal, Temney) ;

selon d'autres encore, la papaïne agirait aussi bien en milieu acide qu'alcalin (Hirsch) (1).

En réalité, il semble que l'optimum varie avec le substrat; il est de *p*H 5,5 avec la gélatine, 5,5 avec la peptone d'albumine, 7,2 avec la fibrine (Willstaetter, Grasmann et Ambros, 245).

Il est facile de mettre en évidence l'activité protéolytique de la papaïne (65); il suffit, pour cela, de porter rapidement à 100° de l'albumine en présence de papaïne; l'albumine se liquéfie immédiatement.

L'action de la papaïne sur les protéides sériques est moins nette, car, de même qu'il existe dans le sérum une antipepsine et une antitrypsine, il y a également une antipapaïne, signalée par Ramon (174) et bien étudiée par Pochon (163).

Toutes ces recherches montrent les difficultés que présente l'étude de la protéolyse enzymatique sur le sérum sanguin.

En opérant suivant certaines conditions expérimentales il est possible de diminuer l'activité des antienzymes et d'aborder l'étude de la lyse enzymatique des protéides sériques.

Mais, si l'on veut suivre cette lyse, il faut apprécier le degré d'hydrolyse des protéides et les modifications physico-chimiques qu'ils subissent.

C'est pourquoi, dans la deuxième partie de notre travail, nous avons cru utile de résumer les techniques que nous avons utilisées.

---

(1) Voir à ce sujet les travaux de Fleury (53) et de Fabre et Frossard (48).

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES UTILISÉES

Dosage des aminoacides.

Les méthodes les plus utilisées dans la détermination du degré de la protéolyse sont les techniques de dosage des aminoacides.

Il existe plusieurs moyens d'effectuer ce dosage. Citons les méthodes de Sœrensen (205), de Van Slyke (237), de Forremann Harris (54), de Folin, de Bertrand (13), de Polonovski (167), de Froidevaux (57), etc...

Parmi toutes ces techniques, nous avons choisi celle de Sœrensen, dite azote « au formol », dont le principe et le mode opératoire sont les suivants (232) :

Le groupement caractéristique des acides aminés fixe l'aldéhyde formique pour donner un dérivé méthylénique

$$-CH\begin{<}{COOH}{NH_2} \quad \longrightarrow \quad -CH\begin{<}{COOH}{N = CH_2}$$

qui fonctionne comme acide monobasique et peut être titré

en présence de phtaléine. On peut ainsi doser un acide aminé déterminé.

On prélève 10 cm^3 de solution à doser, on ajoute X gouttes de solution alcoolique de phtaléine à 1 p. 100 et on neutralise exactement avec de l'acide chlorhydrique à 1 p. 100 d'abord, puis avec de la soude N/10 ensuite, jusqu'à légère teinte rose. On ajoute alors en une fois 10 cm^3 de solution de formaldéhyde commerciale à 40 p. 100 exactement neutralisée et on verse dans le liquide devenu acide de la soude N/10 jusqu'à teinte rouge.

Cette teinte doit être aussi identique que possible à celle d'un témoin que l'on a préparé tout d'abord. Pour faire ce témoin, on étend 10 cm^3 de solution de formaldéhyde neutralisée vis-à-vis de la phtaléine avec 20 cm^3 d'eau distillée bouillie, on ajoute X gouttes de phtaléine à 1 p. 100, puis 0,4 cm^3 de soude N/10, de façon à obtenir une teinte rouge vif.

Pour le calcul, on déduit de la quantité de soude versée les 0,4 cm^3 nécessaires pour le virage, et on se base sur le poids moléculaire de l'acide aminé dosé; par exemple, chaque centimètre cube de soude N/10 correspond à 7,5 mg. de glycine, 8,9 mg. d'alanine, etc...

Cette technique a fait l'objet de quelques critiques, notamment en ce qui concerne certaines désaminations éventuelles (229-151) et l'appréciation de la zone de virage (132). Malgré cela, elle donne d'excellents résultats.

Dans nos expériences, nous avons simplement exprimé nos résultats en azote (à 1 cm^3 de soude N/10 correspond 1,4 mg. d'azote).

Obtention des fractions protéidiques du sérum.

Une hydrolyse ne peut pas toujours être suivie par le simple dosage de groupements $—NH^2$, car un protéide peut être scindé en molécules plus petites sans que des liaisons peptidiques aient été hydrolysées.

Dans ce cas, on peut suivre grossièrement le degré d'hydrolyse en utilisant la précipitation par les sels neutres.

Dans nos sérums initiaux, nous avons dosé les globulines (protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation) et les albumines (solubles dans ces conditions). Puis, dans nos sérums hydrolysés, nous avons dosé les fractions précipitant et ne précipitant pas par le sulfate d'ammonium à demi-saturation; les termes « globulines » et « albumines » ne conviennent pas du tout à ces nouvelles fractions, mais le mode opératoire utilisé dans leur obtention est le même que celui mis en jeu pour la séparation des globulines et des albumines dans nos sérums initiaux; c'est pourquoi nous rappelons la technique utilisée pour l'obtention des globulines et des albumines sériques (1).

A un volume déterminé de sérum, on ajoute un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammonium neutralisée. Les globulines précipitent; on les recueille par centrifugation. Les eaux-mères sont mises de côté. Pour purifier les globulines, on les redissout dans un peu d'eau distillée, puis on les précipite de nouveau par une quantité de solution saturée de sulfate d'ammonium égale au volume d'eau distillée qui avait été nécessaire pour redissoudre les globulines. Celles-ci sont recueillies par centrifugation. Les eaux-mères, ajoutées aux précédentes, vont être utilisées pour la précipitation des albumines.

Pour cela, on ajoute un léger excès de sulfate d'ammonium jusqu'à l'apparition d'un léger louche, puis de l'acide sulfurique normal jusqu'au virage au bleu très pâle d'un papier au rouge Congo (*p*H 3,9). Dans ces conditions, les albumines précipitent; il ne reste plus qu'à les recueillir par centrifugation et à éliminer les eaux-mères après avoir vérifié qu'elles ne contiennent plus de protéides. Le précipité d'albumines ainsi obtenu se dissout très facilement

(1) Nous empruntons à la thèse de M^lle^ Martin (136) la description de cette technique.

dans de l'eau légèrement ammoniacale. Ces deux fractions globulines et albumines contiennent d'importantes quantités de lipides qu'il faut éliminer pour le dosage des protéides.

Dosage des protéides et des lipides (1).

a) *Protéides.* — On met le coagulum protéidique en suspension dans quatre fois environ son volume d'alcool à 95°, puis on agite et l'on plonge le tube dans de l'eau bouillante où on le maintient dix minutes environ. On laisse refroidir. On centrifuge, et tandis que le liquide surnageant (qui contient une partie des lipides) est recueilli par décantation, le coagulum est repris de nouveau par quatre fois son volume d'alcool.

On agite et on maintient le tube de nouveau dans l'eau bouillante pendant dix minutes; après refroidissement, on centrifuge et l'alcool surnageant est ajouté au premier. Le culot protéidique est traité une troisième fois par l'alcool que l'on recueille également.

Le coagulum est alors remis en suspension dans trois à quatre fois son volume d'éther, que l'on tiédit. Après vingt minutes de contact, l'éther est recueilli par décantation après centrifugation, puis on effectue, dans les mêmes conditions, un deuxième traitement à l'éther.

Les solutions éthérées, rassemblées avec les solutions alcooliques, serviront pour le dosage de lipides. Il faut maintenant éliminer du coagulum protéidique les substances hydrosolubles qu'il peut contenir (et en particulier le sulfate d'ammonium).

On le met donc en suspension dans de l'eau bouillante. On centrifuge pour éliminer cette eau et on effectue un deuxième lavage dans les mêmes conditions.

---

(1) Ces lignes sont empruntées à un travail de Duboy (40).

Le tube de centrifugeuse avec son contenu est enfin placé dans une étuve à 105°-110° pendant 24 heures, puis dans un dessiccateur à vide contenant de l'acide sulfurique ou de l'anhydride phosphorique, où on le laisse jusqu'à ce que son poids reste constant.

Le tube de centrifugeuse ayant été préalablement taré vide, on peut déduire de la pesée finale la quantité de protéides contenue dans la fraction précipitée.

b) *Lipides.* — L'ensemble des solutions éthérées et alcooliques est placé dans un ballon adapté par un rodage à un réfrigérant descendant relié à un second ballon muni d'une tubulure latérale que l'on met en communication avec une trompe à vide. On chauffe en plaçant le ballon dans l'eau chauffée par une résistance électrique, et l'on poursuit ainsi la distillation de l'éther, puis de l'alcool.

Le résidu est alors repris par quelques centimètres cubes de chloroforme, qui ne dissout que les lipides. La solution filtrée est placée dans une fiole de Fourneau préalablement tarée. Après évaporation du chloroforme sous un courant d'azote (afin d'éviter l'oxydation des acides gras), la fiole avec son contenu, est placée dans un dessiccateur à vide jusqu'à poids constant.

On déduit ainsi le poids des substances lipoïdiques fixées sur les protéides de la fraction étudiée.

Dosage du phosphore lipidique (1).

Nous avons effectué le microdosage du phosphore par la technique de Machebœuf (118-119).

a) *Destruction.* — Une partie de l'extrait lipidique précédemment obtenu est placé dans un petit matras de Kjeldahl avec 1 cm^3 d'acide sulfurique pur et 2 cm^3 d'acide nitrique pur. On porte à l'ébullition; si la liqueur reste

(1) Voir Duboy (40).

fortement colorée, après la disparition des vapeurs nitreuses, on ajoute de nouveau 0,5 ou 1 cm^3 d'acide nitrique, et l'on poursuit la destruction jusqu'à obtention d'une solution parfaitement décolorée.

b) *Dosage.* — Au cours de la destruction, le phosphore lipidique a été quantitativement transformé en acide phosphorique.

Après refroidissement, on ajoute 6 cm^3 d'eau et 2 cm^3 d'une solution saturée de nitrate d'ammonium, puis on porte au bain-marie pendant quinze minutes. A ce moment, on ajoute 6 cm^3 d'une solution de molybdate d'ammonium : 5 p. 100 et on laisse encore 10 minutes au bain-marie. Après refroidissement, on ajoute 5 cm^3 d'alcool à 95°. Il s'est formé un précipité de phosphomolybdate d'ammonium qui se rassemble au fond du matras. On filtre sur un filtre d'Iéna G4 monté sur fiole à vide. On rince avec de l'alcool à 50° jusqu'à ce que les alcools de lavage ne rougissent plus un papier bleu de tournesol. La fiole à vide est alors bien rincée.

Le précipité resté dans le matras et celui retenu sur le filtre sont dissous dans 1 à 2 cm^3 d'ammoniaque au quart. On rince à plusieurs reprises le matras et le filtre jusqu'à ce que tout le précipité soit dissous.

Le contenu de la fiole à vide est alors placé dans un grand matras de Kjeldahl et additionné de 10 cm^3 de solution de soude N/20 et de II gouttes de solution alcoolique de phtaléine du phénol à 0,5 p. 100. L'ensemble est porté à l'ébullition jusqu'à ce que l'ammoniaque soit entièrement chassé.

Il s'est formé un précipité de phosphomolybdate de sodium et on dose l'excès de soude. Pour cela, on ajoute 10 cm^3 d'une solution d'acide sulfurique N/20; on porte à l'ébullition et l'on titre à la soude N/20 en prenant bien soin de ne pas laisser refroidir.

Le nombre de centimètres cubes de soude utilisée mul-

tiplié par 0,056 donne le poids de phosphore (en mg.) de la prise d'essai.

Dosage du cholestérol (1).

Le dosage du cholestérol a été fait sur l'extrait lipidique préalablement saponifié.

Pour effectuer cette saponification, on ajoute dans la fiole contenant l'extrait lipidique 10 cm³ d'une solution de potasse dans l'alcool à 2 p. 100, puis on porte à l'ébullition avec un réfrigérant ascendant sur une platine chauffante pendant deux heures environ. On place ensuite l'extrait alcoolo-potassé dans une ampoule à décanter.

On ajoute 10 cm³ d'éther de pétrole, on agite, il se constitue une phase unique alcoolo-pétrolique limpide. On ajoute un volume d'eau égal au volume d'alcool, on agite, il se sépare alors deux phases distinctes : l'une alcoolo-aqueuse qui contient des savons et le glycérol, l'autre, éthéro-pétrolique qui contient le cholestérol et les autres substances insaponifiables (insaponifiable X). Les deux phases sont séparées par décantation. La phase pétrolique, lavée par agitation avec un peu d'alcool à 50°, est enfin évaporée. C'est sur le résidu de cette évaporation qui constitue l'insaponifiable total, que l'on effectue le dosage colorimétrique du cholestérol par rapport à un témoin, grâce à la réaction de Liebermann-Burchard (111-19).

Nous avons vérifié un certain nombre de nos dosages de cholestérol sur nos sérums initiaux en utilisant la méthode de Tayeau (220) : si, à 3 cm³ de sérum, on ajoute 0,5 cm³ d'une solution de saponoside (à aglycone cyclopenténophénanthrénique) à 10 p. 100 et si l'on agite l'ensemble avec de l'éther, ce solvant extrait la totalité du cholestérol. Sur le résidu d'évaporation de l'éther, on effectue la réaction du cholestérol que l'on compare avec un témoin.

(1) Voir la thèse de M^lle^ Vanaud (236), p. 43.

Dosage de l'azote total.

Les quelques dosages d'azote total mentionnés dans notre travail ont été effectués par la technique de Kjeldahl, avec l'appareil de Parnas et Wagner.

Hydrolyses enzymatiques.

Pour nos protéolyses, dont on trouvera la description dans la partie expérimentale de notre travail, nous avons utilisé un thermostat Prolabo avec agitateur électrique.

TROISIEME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Chapitre Premier

Action de la pepsine sur les protéides du sérum sanguin

Dans notre étude historique, nous avons exposé les difficultés que présente l'hydrolyse des protéides sériques à l'aide d'enzymes, mais nous avons vu que, si l'on opère dans certaines conditions que nous préciserons plus loin, il est possible d'atténuer le rôle joué par les antienzymes.

Nos recherches concernant l'action des agents protéolytiques sur les protéides sériques tendent vers un double but :

1° Etudier les fractions du sérum sur lesquelles les enzymes portent leur action;

2° Etudier la lipophanérèse provoquée dans le sérum par la protéolyse enzymatique.

Nous commençons tout d'abord par envisager l'action de la pepsine. Ainsi que nous l'avons signalé précédemment, cette action de la pepsine sur le sérum avait déjà été étudiée par Sandor et Delage. Un court exposé de leur travail est donné dans la thèse de Sandor (193). Ce dernier s'exprime ainsi :

« Les liaisons lipoprotéidiques du sérum présentent une résistance extrême à l'effet peptique. Nous avons étudié, avec l'aide de B. Delage, l'extraction éthérée après l'action de la pepsine. Le sérum fut soumis à l'action de différents échantillons de pepsine à des concentrations variables en ions hydrogène. La digestion peptique fut prolongée pendant trois jours. Toutes ces expériences donnèrent le même résultat : l'extraction éthérée n'a subi aucune augmentation sous l'influence de la pepsine. Le comportement du sérum est ici foncièrement différent de celui d'autres tissus comme le tissu musculaire, pour lesquels la pepsine est capable d'opérer la lipophanérose. »

Les auteurs ne précisent pas les conditions expérimentales de leur travail et n'ont pas étudié les fractions protéidiques attaquées par la pepsine.

Signalons que dans un travail inédit, F. Tayeau et J. Chelle avaient constaté, ainsi que Sandor et Delage, que l'extraction éthérée ne subissait aucune modification sous l'influence non seulement de la pepsine, mais encore de la trypsine et de la papaïne.

Dans nos expériences, nous avons pris soin d'opérer en présence d'un antiseptique afin d'éliminer les putréfactions. De plus, nous avons désiré opérer en présence d'une substance réductrice (176), afin d'activer la protéolyse.

Beaucoup d'auteurs emploient à cet effet la vitamine C ou le glutathion (Purr, 172; Waldschmidt-Leitz, 239) ; nous avons utilisé le cyanure de potassium (Saivand) qui donne

d'excellents résultats et qui possède, en même temps, des propriétés antiseptiques (1).

Notre expérience a été effectuée de la façon suivante :

Nous avons préparé sept ballons, numérotés de 1 à 7 et contenant chacun :

50 cm³ de sérum de Cheval, 0,5 cm³ d'une solution de cyanure de potassium à 7,5 p. 100, 12 cm³ d'acide chlorhydrique normal (2) (sauf le n° 1 qui a reçu 12 cm³ d'eau), puis 10 cm³ d'une solution de pepsine à 20 p. 100.

Le mélange avait un *p*H de 1,4 (mesuré au potentio-*p*H-mètre Jouan).

Sur l'échantillon n° 1, nous avons immédiatement prélevé des portions aliquotes afin d'effectuer des dosages d'azote aminé, de protéides totaux (3), de lipides liés à ces protéides et de phosphore lipidique.

De plus, une autre portion aliquote a été agitée avec de l'éther, et l'extrait éthéré a été analysé (dosage des lipides, du cholestérol et du phosphore).

Les six autres échantillons ont été bouchés (afin d'éviter le départ de l'acide cyanhydrique) et portés au thermostat à la température de 40°.

Puis nous avons enlevé les ballons après séjour d'une demi-heure (n° 2), deux jours (n° 3), quatre jours (n° 4), sept jours (n° 5), dix jours (n° 6), quinze jours (n° 7).

Sur chaque échantillon, nous avons, en prélevant des parties aliquotes, dosé l'azote aminé, les protéides totaux, les lipides fixés aux protéides. De plus, une autre portion

---

(1) Dans une protéolyse peptasique, on n'utilisera pas le toluène comme antiseptique, car il a une action inhibitrice sur la pepsine (Ying-Laï-Wang, 249).

(2) On sait que la pepsine n'est active qu'en milieu acide. Afin d'amener nos mélanges à un pH convenable, nous avons préalablement effectué des courbes représentatives des variations du *p*H en fonction du volume d'acide chlorhydrique normal ajouté au mélange.

(3) Il n'est pas question ici de doser les globulines et les albumines. On sait qu'à *p*H 1,4 le sulfate d'ammonium à demi-saturation précipite tous les protéides (120).

a été mise en contact avec de l'éther et l'extrait éthéré a été analysé.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° I (les chiffres sont rapportés à 1 litre de sérum traité).

Au tableau n° I correspondent les courbes des figures 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7.

L'examen de nos résultats et l'interprétation de nos courbes permettent d'émettre quelques conclusions sur l'hydrolyse peptasique du sérum sanguin.

La figure 1 montre que, très rapidement, la pepsine agit sur certaines liaisons peptidiques en libérant des groupements amine, mais l'hydrolyse semble s'arrêter très vite, car, après 15 jours, l'azote aminé a conservé la même valeur qu'après 4 jours.

Parallèlement à cette action, les protéides ont été entièrement transformés en protéoses, puisqu'ils ne sont plus précipitables par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et à *p*H 1,4.

Mais, si l'on examine les variations des poids de substances lipoïdiques fixées aux protéides en fonction du temps de protéolyse (fig. 3), on constate que, si ces substances suivent les protéides, elles diminuent beaucoup moins rapidement que ces derniers, et ceci nous amène à conclure que la pepsine, agissant sur le sérum sanguin, porte tout d'abord son action sur les cénapses les moins riches en lipides; elle porte surtout son action sur les cénapses contenant le moins de phosphatides (fig. 4). Ceci ne doit pas nous étonner, car l'on sait (Rondoni, 187) que les lécithines possèdent la propriété sinon d'inhiber, tout au moins de ralentir l'activité des protéases.

L'examen du taux de substances lipoïdiques extractibles par l'éther au fur et à mesure de l'hydrolyse montre que cette dernière a modifié quelque peu l'édifice protéidique, puisque, parallèlement à l'hydrolyse, le taux du cholestérol

TABLEAU I

Numéros	Durée de l'hydrolyse	N aminé (g.)	Protéides totaux (1) (g.)	Lipides liés aux protéides (g.)	Phosphore lipidique (mg.)	Lipides extraits par agitation avec de l'éther (g.)	Cholestérol extrait par agitation avec de l'éther (g.)	P lipidique extrait par agitation avec de l'éther (mg.)
1	0	1,09	87,0	5,42	32,9	3,56	0,30	2,55
2	1/2 heure	1,09	19,8	2,96	26,6	»	»	2,70
3	2 jours	2,12	1,94	1,62	18,5	3,1	0,54	17,8
4	4 jours	2,30	0	0	0	3,1	0,50	16,5
5	7 jours	2,42	0	0	0	2,5	0,57	3,22
6	10 jours	2,41	0	0	0	2,3	0,49	2,5
7	15 jours	2,42	0	0	0	2,3	»	2,4

(1) Notre sérum contenait 15,3 g. d'azote total par litre et 0,8 g. de cholestérol.

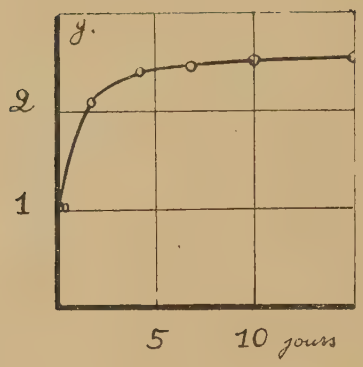


FIG. 1

Courbe représentative des variations du poids (en g. par litre) d'azote aminé en fonction de la durée d'hydrolyse peptasique.

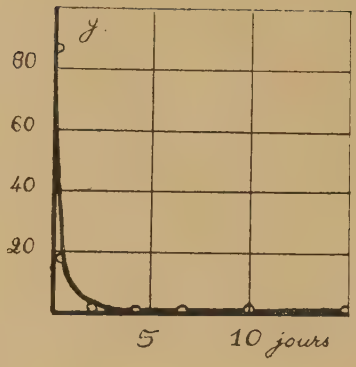


FIG. 2

Courbe représentative des variations du poids de protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée d'hydrolyse peptasique.

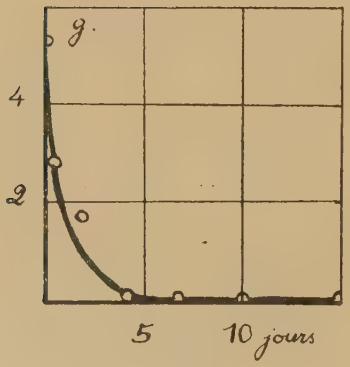


FIG. 3

Courbe représentative des variations du poids de substances lipoïdiques liées aux protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse peptasique.

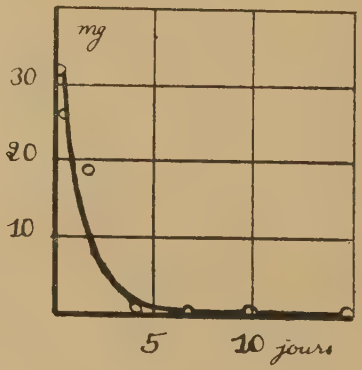


FIG. 4

Courbe représentative des variations du poids de phosphore lipidique lié aux protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse peptasique.

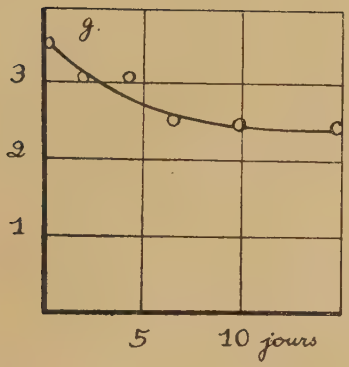


FIG. 5

Courbe représentative des variations du poids de substances lipoïdiques extraites par l'éther de 1000 cm³ de sérum, en fonction de la durée de l'hydrolyse peptasique.

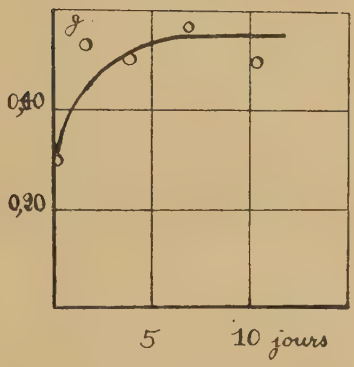


FIG. 6

Courbe représentative des variations du poids de cholestérol extrait par l'éther de 1000 cm³ de sérum, en fonction de la durée de l'hydrolyse peptasique.

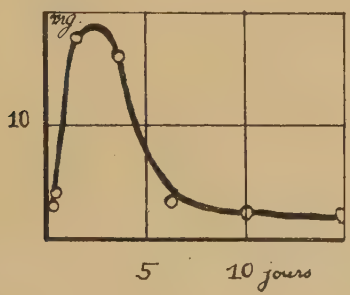


FIG. 7

Courbe représentative des variations du poids de phosphore lipidique extrait par l'éther de 1000 cm³, en fonction de la durée de l'hydrolyse peptasique.

et des phosphatides extraits par l'éther a augmenté dès le début de l'opération. Cependant, après un certain temps, le taux du cholestérol se stabilise, comme le taux de l'azote aminé. Au contraire, le taux du phosphore lipidique (phosphoaminolipides) diminue rapidement pour retomber à peu près à sa valeur initiale. A notre avis, ceci est dû simplement au fait qu'à *p*H 1,4, les phosphatides s'hydrolysent à la longue, et leurs constituants, surtout l'acide phosphorique qui sert à les doser, ne sont pas solubles dans l'éther et restent au sein de la phase aqueuse.

Conclusions du Chapitre I

Dans certaines conditions, la pepsine agit sur les protéides du sérum sanguin; elle attaque tout d'abord les protéides libres ou les cénapses les moins riches en lipides, surtout en phosphatides.

Cette attaque ne porte que sur une partie de l'azote: malgré cela, l'édifice protéidique subit d'importantes modifications, puisqu'au cours de cette protéolyse une légère lipophanérèse est apparue.

Chapitre II

Action de la trypsine sur les protéides du sérum sanguin

Nous n'avons pas trouvé d'étude de la protéolyse trypsique sur le sérum sanguin. Cette protéolyse doit être effectuée dans certaines conditions en raison de l'activité particulièrement marquée de l'antitrypsine. Celle-ci, heureusement, perd son activité dès que le milieu atteint la température de 50° (Weinberg et Rubinstein, 241).

Dans cette expérience, nous avons préparé sept échantillons numérotés de 1 à 7 et contenant chacun 50 cm^3 de sérum de Cheval et 12 cm^3 d'eau, et nous avons laissé les échantillons pendant un quart d'heure au bain-marie à 50°. Nous avons ramené la température à 40° ; nous avons ajouté 10 cm^3 d'une solution de trypsine à 20 p. 100 (sauf dans le n° 1), 0,5 cm^3 d'une solution de cyanure de potassium à 7,5 p. 100 et nous avons bouché les ballons contenant ces produits. Après agitation, les ballons numérotés de 2 à 7 ont été placés au thermostat à 40°. Le ballon n° 1 (sans trypsine) a été conservé comme témoin. Les ballons ont été retirés du thermostat après deux jours (n° 2), quatre jours (n° 3), sept jours (n° 4), dix jours (n° 5), quinze

jours (n° 6) et vingt-quatre jours (n° 7). Sur chaque échantillon, nous avons dosé l'azote aminé, les protéides totaux, les protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation, les protéides solubles dans ces conditions, les lipides fixés à ces deux variétés de protéides et les phosphatides qu'ils contiennent. Comme précédemment, nous avons mis de côté une partie aliquote de chaque échantillon et nous l'avons agitée avec de l'éther. Dans l'extrait éthéré, nous avons dosé les substances lipoïdiques, le cholestérol et le phosphore. Les résultats que nous avons obtenus se trouvent réunis dans le tableau n° II (chacun d'eux correspondant à 1 litre de sérum traité) auquel correspondent les figures des courbes n°s 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 et 15.

L'examen des résultats et des courbes permet les conclusions suivantes :

Notons, tout d'abord, que l'hydrolyse tryptasique est beaucoup plus active que l'hydrolyse peptasique, puisque l'azote aminé, à la fin de l'opération, atteint le taux de 6,55 g., alors qu'avec la pepsine le chiffre de 2,42 n'était pas dépassé (1) ; de plus, l'action de la trypsine se manifeste plus longuement (2).

Malgré cela, nos milieux, même à la fin de l'opération, contiennent encore une appréciable quantité de protéides. Ce fait est intéressant à signaler et montre que le degré d'hydrolyse d'un protéide ne peut pas être apprécié par sa solubilité dans les solutions salines (3).

L'examen des courbes n°s 9 et 11 montre très nettement que les protéides diminuent beaucoup plus rapidement au

(1) Une autre expérience a donné le même résultat.

(2) L'action de la trypsine peut être très marquée si on opère en présence d'alcool à 20 p. 100 (177 bis).

(3) Ceci explique en particulier la disparition des termes: « albumoses », « peptones », etc..., et leur remplacement par le terme unique de : « protéoses » (voir page 30).

TABLEAU II

Nos	Durée de l'hydrolyse	Azote aminé (1) (g.)	Protéides totaux (g.)	Protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium 1/2 saturé (g.)	Protéides solubles dans le sulfate d'ammonium 1/2 saturé (g.)	Lipides totaux (g.)	Lipides liés aux protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium 1/2 saturé (g.)	Lipides liés aux protéides solubles dans le sulfate d'ammonium 1/2 saturé (g.)	P lipidique (mg.)	Lipides extraits par agitation avec de l'éther (g.)	Cholestérol extrait par agitation avec de l'éther (g.)	P extrait par agitation avec de l'éther (mg.)
1	témoin (0)	1,39	87,0	67,6	19,4	5,42	4,74	0,68	32,9	0,35	0,30	2,55
2	2 jours	2,52	69,2	54,5	14,7	5,07	4,21	0,86	30,2	0,36	0,35	2,55
3	4 jours	3,61	56,3	47,7	8,6	4,18	2,96	1,22	21,5	»	0,38	2,28
4	7 jours	5,71	32,5	25,8	6,7	4,16	2,34	1,82	19,6	0,45	0,31	2,69
5	10 jours	5,20	34,8	31,6	3,2	»	2,88	»	20,5	0,39	0,35	1,88
6	15 jours	5,71	30,9	28,0	2,9	3,51	2,25	1,26	21,1	0,41	0,33	3,36
7	24 jours	6,55	13,6	10,9	2,7	4,22	2,10	2,12	»	0,39	0,37	2,96

(1) Le sérum contenait 15,3 g. d'azote total par litre et 0,8 g. de cholestérol.

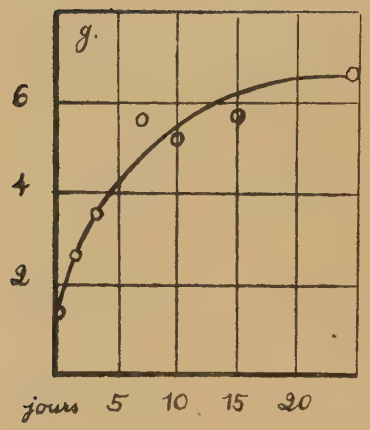


FIG. 8

Courbe représentative des variations du poids (en g. par litre) d'azote aminé en fonction de la durée de l'hydrolyse tryptasique.

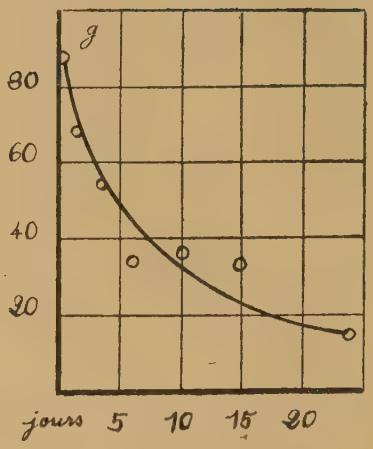


FIG. 9

Courbe représentative des variations du poids de protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse tryptasique.

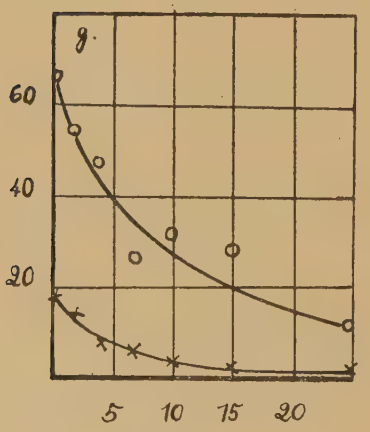


FIG. 10

Courbes représentatives des variations du poids de protéides insolubles (*o*) et solubles (*x*) dans le sulfate d'ammonium demi-saturé (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse tryptasique.

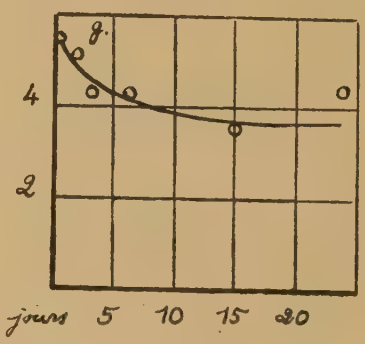


FIG. 11

Courbe représentative des variations du poids de lipides fixés aux protéides totaux (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse tryptasique.

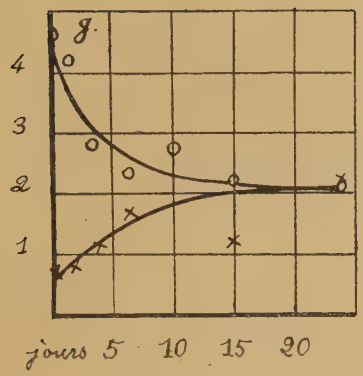


FIG. 12

Courbes représentatives des variations du poids de lipides fixés aux protéides insolubles (*o*) et solubles (*x*) dans le sulfate d'ammonium demi-saturé (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse tryptasique.

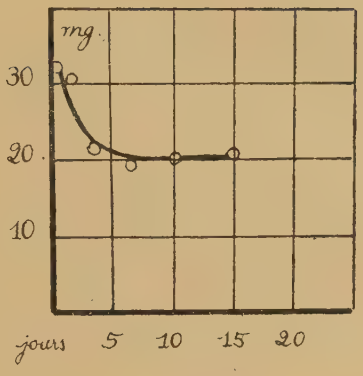


FIG. 13

Courbe représentative des variations du phosphore lipidique fixé aux protéides totaux (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse tryptasique.

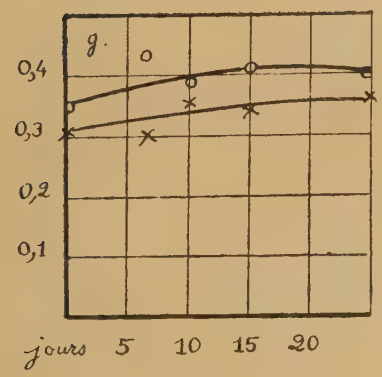


FIG. 14

Courbes représentatives des variations du poids de lipides (*o*) et de cholestérol (*x*) (de 1.000 cm³ de sérum) extraits par l'éther en fonction de la durée de la protéolyse tryptasique.

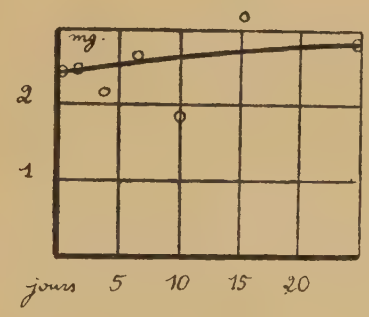


FIG. 15

Courbe représentative des variations du poids de phosphore lipidique (de 1.000 cm³ de sérum) extrait par l'éther en fonction de la durée de la protéolyse tryptasique.

cours de l'hydrolyse que les lipides qui les accompagnent. A l'origine, les lipides représentent en effet 6,2 p. 100 des protéides, tandis qu'après quinze jours d'hydrolyse, ils en représentent 11,3 p. 100 et après vingt-quatre jours 31 p. 100.

La trypsine commence donc par s'attaquer aux protéides libres, puis aux cénapses les moins riches en lipides.

Nous avions déjà constaté ce fait précédemment à propos de la pepsine. Il est encore plus net avec la trypsine. Cette fois, les phosphatides diminuent parallèlement aux lipides; ceci n'est pas étonnant, car le pouvoir inhibiteur des lécithines ne s'exerce pas aussi nettement vis-à-vis de la trypsine que vis-à-vis de la pepsine (voir page 46).

L'examen des courbes n^{os} 10 et 12 permet également d'intéressantes conclusions :

Remarquons, en effet, que le taux des protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium demi-saturé diminue beaucoup plus rapidement que le taux des protéides solubles dans le même solvant. L'examen de nos résultats permet de supposer que les cénapses lipidoprotéidiques sont dégradées suffisamment par la trypsine pour perdre leur insolubilité dans le sulfate d'ammonium demi-saturé; dans ces conditions, elles deviennent solubles dans ce solvant, mais elles ne sont pas encore suffisamment dégradées pour perdre leur caractère de protéides. Ces cénapses sont alors dosées avec les albumines, et leurs propres lipides se trouvent ajoutés à ceux des albumines. Ceci nous explique l'aspect de la figure 12 : tandis que les lipides fixés aux globulines diminuent au fur et à mesure de l'hydrolyse, les lipides fixés aux albumines augmentent (1).

En comparant tous ces résultats avec ceux que nous avons

(1) Notons que les termes « globulines » et « albumines » utilisés ici sont assez inexacts, car le sérum ayant séjourné au thermostat ne se conduit pas du tout comme un sérum frais. Le lecteur saura qu'il s'agit, en réalité, des protéides insolubles et solubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

obtenus dans le chapitre précédent à propos de la protéolyse pepsique, on pourrait croire que l'édifice protéidique a subi une dégradation beaucoup plus importante avec la trypsine qu'avec la pepsine et qu'ici la lipophanérèse (1) va être beaucoup plus nette. Il n'en est rien, ainsi que le montrent les courbes des figures 14 et 15, car, malgré l'hydrolyse très avancée des protéides, on peut dire que l'éther n'extrait pratiquement pas plus de lipides après qu'avant la protéolyse.

Ceci constitue une preuve supplémentaire de la spécificité des enzymes. L'attaque peptasique de certaines liaisons provoque une lipophanérèse partielle; il n'en est pas du tout de même pour l'attaque tryptasique.

Conclusions du Chapitre II

Dans certaines conditions que nous avons précisées, la trypsine agit sur les protéides du sérum sanguin en attaquant les protéides libres et quelques cénapses lipidoprotéidiques les moins riches en lipides.

Malgré une hydrolyse très appréciable des protéides, aucune lipophanérèse n'apparaît.

(1) Avant l'extraction par l'éther, on a vérifié que le sérum n'avait pas subi de putréfaction et ne s'était pas alcalinisé.

Chapitre III

Action de la papaïne sur les protéides du sérum sanguin

De très nombreuses recherches ont été effectuées sur la protéolyse papaïnique, et les chercheurs qui se sont intéressés à cette question conseillent d'utiliser des activateurs; parmi ceux-ci, mentionnons le glutathion réduit (Waldschmidt-Leitz et Deutsch, 239), l'acide ascorbique (Maschmann, 137), les ions fer (Stern, 211) (1).

Dans nos premières expériences, nous avions utilisé les sels ferreux, mais, en raison de l'affinité des protéides pour certains ions (Machebœuf et Viscontini, 131) et pour les ions fer en particulier (Machebœuf, Tayeau et Parlange), nous obtenions des précipités protéidiques insolubles qui s'éliminaient de la réaction. Aussi, avons-nous dû, par la suite, abandonner les sels ferreux.

Dans nos premières expériences, nous ne prenions pas

(1) Notons que, suivant les cas, certains composés du fer et en particulier le ferricyanure de potassium peuvent exalter ou inhiber l'activité de la papaïne (Maschmann et Helmert, 139; Krebs, 100-101).

La vitamine C n'activerait la protéolyse papaïnique qu'en présence de fer; en l'absence de fer, elle l'inhiberait (Maschmann et Helmert, 138).

soin de chauffer préalablement notre sérum (diminution de l'activité antipapaïnique) ; aussi, n'obtenions-nous qu'une hydrolyse très légère ; de plus, il ne se produisait aucune lipophanérèse. Quelques essais rapides montrèrent qu'à la longue, une notable quantité de protéides se dénaturait. Voici, à titre indicatif, les résultats que nous avions obtenus dans l'une de nos expériences (tableau n° III, résultats ramenés à 1 litre de sérum traité) :

TABLEAU III

Durée de l'hydrolyse	Azote (1) aminé (g.)	Protéides totaux (g.)	Lipides totaux (g.)	Phosphore lipoïdique (mg.)	Lipides extraits par agitation avec de l'éther (g.)
0 (témoin)	0,56	80,9	4,61	39,5	0,60
2 jours	0,61	81,6	4,46	39,2	0,54
5 jours	0,64	82,1	4,10	40,3	0,67
10 jours	0,64	76,7	»	35,3	0,32
16 jours	0,78	75,6	»	40,8	»
27 jours	0,78	70,2	4,12	35,8	0,48
37 jours	0,78	71,8	4,31	»	0,34

Dans une nouvelle série d'essais, nous avons donc modifié nos conditions d'expérience.

Nous avons préparé neuf ballons numérotés de 1 à 9 contenant chacun 70 cm³ de sérum de cheval, 70 cm³ d'eau physiologique (2), puis de l'acide chlorhydrique N, afin que le *p*H soit d'environ 5,4 (sauf pour le n° 1). Après mélange, chaque ballon est porté 15 minutes à 70°. On laisse refroidir et on ajoute 0,7 cm³ d'une solution de papaïne à 3 p. 100 et 0,7 cm³ d'une solution de cyanure de potassium à 7,5 p. 100. Après mélange, tous les ballons, sauf le

(1) Notre sérum contenait 13 g. d'azote total par litre.

(2) Il est bon que le milieu ne soit pas trop visqueux (Renaud, 177).

n° 1 (témoin) (1), sont portés au thermostat à 60°. On les retire après une demi-heure (n° 2), six jours (n° 3), dix jours (n° 4), treize jours (n° 5), dix-sept jours (n° 6), vingt-quatre jours (n° 7), vingt-sept jours (n° 8) et trente-trois jours (n° 9).

Sur chaque échantillon, on détermine l'azote aminé, les protéides totaux (2), les protéides insolubles et solubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation, les lipides totaux, les lipides fixés aux protéides insolubles et solubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

De plus, on étudie également l'extrait éthéré. Dans le tableau n° IV sont rassemblés les résultats que nous avons obtenus; ils sont ramenés à 1.000 cm^3 de sérum.

Au tableau n° IV correspondent les courbes des figures 16, 17 et 18.

Dans chacun de nos échantillons, nous avons prélevé une partie aliquote que nous avons agitée avec de l'éther. Les extraits éthérés ont été analysés, mais les quantités de lipides qu'ils contenaient étaient infimes; aussi, nous ne les avons même pas mentionnées dans le tableau n° IV.

Aucune lipophanérèse ne se produit donc au cours de l'hydrolyse papaïnique du sérum sanguin.

L'examen de nos résultats et de nos courbes montre qu'en suivant le mode opératoire que nous avons indiqué, on peut effectuer une hydrolyse partielle des protéides sériques à l'aide de la papaïne; cette hydrolyse atteint à peu près le même taux que celle effectuée à l'aide de la pepsine.

Bien que cette hydrolyse ne soit pas très poussée, il est intéressant de remarquer que la solubilité des protéides

---

(1) Notre témoin contient de la papaïne; ceci n'a pas d'importance, car on sait qu'à la température ordinaire, la papaïne n'a aucune action digestive (Delezenne, Mouton et Pozerski, 34).

(2) La presque totalité des protéides précipite avec le sulfate d'ammonium à demi-saturation en raison du pH auquel nous opérons.

TABLEAU IV

Numéros	Durée de l'hydrolyse	Azote aminé (g.)	Protéides totaux (g.)	Protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)	Protéides solubles dans le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)	Lipides totaux (g.)	Lipides liés aux protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)	Lipides liés aux protéides solubles dans le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)
1	0 (témoin)	0,63	103,6	52,5	51,1	4,8	3,5	1,3
2	1/2 heure	»	102,9	102,9	0	»	2,5	»
3	6 jours	1,36	17,7	16,6	1,1	4,0	3,0	1,0
4	10 jours	1,55	15,7	15,2	0,5	4,3	3,3	1,0
5	13 jours	»	14,0	13,6	0,4	2,6	2,5	0,16
6	17 jours	2,22	9,1	8,2	0,3	2,9	2,4	0,5
7	24 jours	»	8,8	8,3	0,5	1,8	1,8	0
8	27 jours	3,50	4,0	4,0	0	2,1	2,1	0
9	33 jours	4,06	3,9	3,9	0	2,3	2,3	0

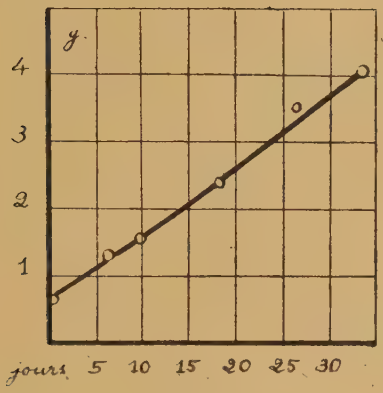


FIG. 16

Courbe représentative des variations du poids (en g. par litre) d'azote aminé en fonction de la durée d'hydrolyse papaïnique.

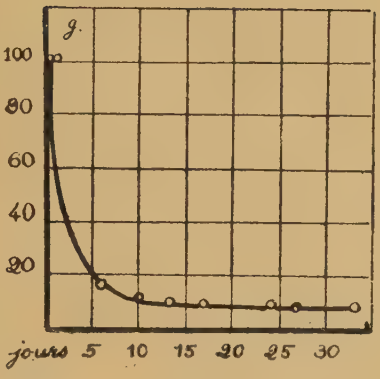


FIG. 17

Courbe représentative des variations du poids de protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse papaïnique.

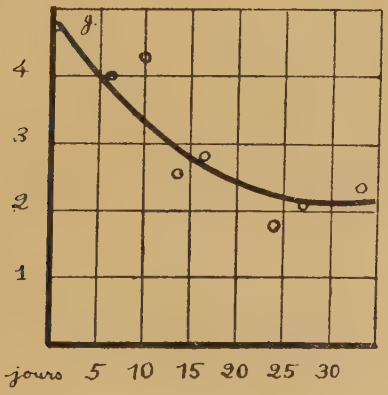


FIG. 18

Courbe représentative des variations du poids de lipides fixés aux protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse papaïnique.

dans le sulfate d'ammonium s'est considérablement modifiée.

Au début de l'opération, presque tous les protéides précipitent avec le sulfate d'ammonium à demi-saturation; ceci s'explique en raison du *p*H auquel nous opérons (5,4) (1).

Puis, nous voyons que les protéides deviennent de plus en plus solubles, puisque après trente-trois jours d'hydrolyse, il ne reste plus que le vingt-cinquième environ des protéides initiaux. D'autre part, les lipides liés aux protéides n'ont seulement diminué que de moitié.

Le phénomène est encore ici très net : la papaïne n'attaque que les protéides libres ou bien les cénapses pauvres en lipides. Remarquons, enfin, que les phosphatides suivent à peu près les lipides.

Conclusions du Chapitre III

En opérant dans certaines conditions, la papaïne peut provoquer une hydrolyse partielle (2) des protéides sériques. Ici encore, les protéides libres sont attaqués tout d'abord; les cénapses lipido-protéidiques riches en lipides semblent résister à l'attaque enzymatique.

Comme dans le cas de la trypsine, aucune lipophanérèse n'apparaît.

Remarquons, en résumé, que les enzymes protéolytiques que nous avons étudiés (pepsine, trypsine, papaïne) attaquent surtout dans le sérum les protéides libres ; ils semblent respecter les cénapses lipidoprotéidiques.

Il nous paraît intéressant de rapprocher cette remarque des travaux de Modern et Ruff (145) qui ont remarqué que,

(1) On sait que vers *p*H 5, une grande partie des protéides sériques précipite par le sulfate d'ammonium à demi-saturation (120).

(2) La papaïne ne permet jamais une hydrolyse totale (Leipert et Häfner, 108).

par digestion, on peut arriver à enrichir en unités un sérum antidiphtérique. Cet enrichissement est mesuré par la méthode de floculation de Ramon. Or, on sait le rôle joué par les lipides dans cette réaction de floculation (Linderstrôm-Lâng et Schmidt, 113). Il n'est donc pas étonnant qu'un sérum, dans lequel les substances ne jouant aucun rôle dans la floculation se trouvant éliminées, s'enrichisse en unités antitoxiques.

Chapitre IV

Action des bactéries de la putréfaction sur les protéides du sérum sanguin

Les bactéries de la putréfaction secrètent des enzymes et lorsque du sérum sanguin est placé dans une étuve sans aucune précaution d'asepsie, il se produit une hydrolyse due non seulement aux bactéries, mais encore aux diastases autolytiques qui se trouvent dans les tissus.

Nous avons désiré étudier cette hydrolyse. Pour cela nous avons préparé six échantillons de 30 cm^3 de sérum de cheval; cinq d'entre eux ont été placés à l'étuve à 37° et retirés après un séjour de six heures (n° 2), un jour (n° 3), cinq jours (n° 4), dix jours (n° 5), quinze jours (n° 6). L'échantillon n° 1 a servi de témoin.

Sur chacun de nos échantillons, nous avons dosé l'azote aminé, les protéides totaux, les protéides insolubles et solubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation, les lipides totaux, les lipides fixés aux protéides insolubles et solubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation et le phosphore lipidique. Enfin, sur une partie aliquote de chaque échantillon, nous avons effectué une extraction éthé-

rée comme précédemment. Nos résultats, ramenés à un litre de sérum traité, sont rassemblés dans le tableau n° V, auquel correspondent les figures 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 et 26.

Remarquons qu'au début de l'opération, l'azote aminé diminue; ceci s'explique : les bactéries n'ont pas encore eu beaucoup le temps d'agir et il s'est produit un début de coagulation qui provoque toujours une diminution du nombre des fonctions amines libres. Plus tard, les bactéries entrent en activité, et l'on voit l'azote aminé atteindre un taux appréciable (plus de 14 p. 100 de l'azote total) (1).

Les protéides sont peu à peu dégradés et, à la fin de l'opération, ils ne représentent plus que 13 p. 100 des protéides initiaux. Constatons, de nouveau, que les lipides fixés aux protéides diminuent beaucoup moins rapidement que ces derniers.

Après quinze jours d'hydrolyse, les lipides fixés aux protéides représentent plus de 28 p. 100 des lipides initiaux, alors que les protéides ne représentent que 13 p. 100 des protéides initiaux.

Il faut donc admettre ici encore que les enzymes bactériens et autolytiques portent d'abord leur action sur les protéides libres et sur les cénapses les moins riches en lipides.

Au début de la protéolyse, la lipophanérèse apparaît; elle atteint rapidement un taux appréciable, puis elle reste stationnaire malgré l'évolution importante de la protéolyse. On peut faire la même remarque en ce qui concerne la cholestérophanérèse.

(1) Le sérum traité contient 18,1 p. 1.000 d'azote.

TABLEAU V

Nos	Durée de l'hydrolyse	Azote aminé (g.)	Protéides totaux (g.)	Protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium 1/2 saturé (g.)	Protéides solubles dans le sulfate d'ammonium 1/2 saturé (g.)	Lipides totaux (g.)	Lipides liés aux protéides insolubles dans le sulfate d'ammonium 1/2 saturé (g.)	Lipides liés aux protéides solubles dans le sulfate d'ammonium 1/2 saturé (g.)	Pilipdiquer lié aux protéides (mg.)	Substances extraites par agitation avec de l'éther (g.)	Cholestérol extrait par agitation avec de l'éther (g.)	$\bar{P}$ extrait par agitation avec de l'éther (mg.)
1	0 (témoin)	0,84	115,6	58,7	56,9	7,7	2,5	5,2	56,1	traces indosables	0	traces
2	6 heures	0,46	63,7	29,5	34,2	3,0	0,9	2,1	53,0	1,26	0,22	2,3
3	1 jour	0,42	46,8	22,7	24,0	2,9	1,2	1,7	24,1	0,90	0,32	2,1
4	5 jours	1,26	18,3	5,7	12,6	2,1	1,0	1,1	10,6	1,12	0,32	2,3
5	10 jours	2,38	11,9	4,2	7,7	2,5	1,3	1,2	9,5	0,93	0,44	2,8
6	15 jours	2,57	15,6	4,3	11,3	2,2	1,3	0,9	9,5	0,96	0,44	3,7

Le sérum traité contenait 1,08 g. p. 1.000 de cholestérol.

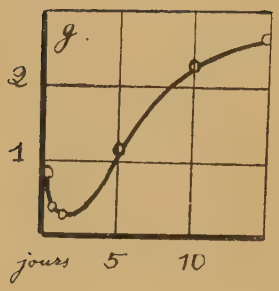


FIG. 19

Courbe représentative des variations du poids (en g. par litre) d'azote aminé en fonction de la durée de l'hydrolyse par les bactéries de la putréfaction.

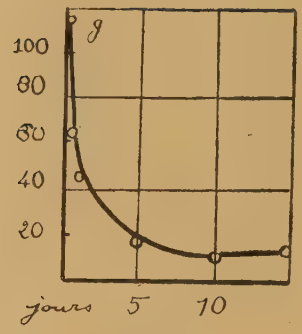


FIG. 20

Courbe représentative des variations du poids de protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse par les bactéries de la putréfaction.

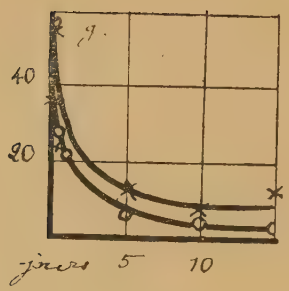


FIG. 21

Courbe représentative des variations du poids de protéides insolubles (*o*) et solubles (*x*) dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée d'hydrolyse par les bactéries de la putréfaction.

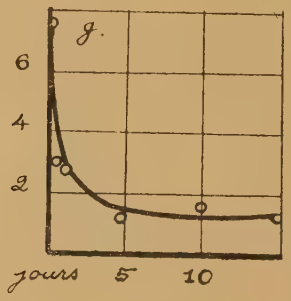


FIG. 22

Courbe représentative des variations du poids des lipides fixés aux protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée d'hydrolyse par les bactéries de la putréfaction.

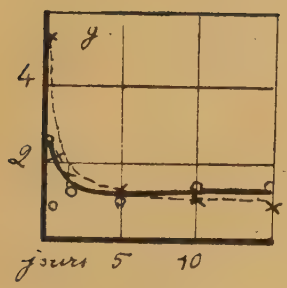


FIG. 23

Courbes représentatives des variations des poids de lipides fixés aux protéides insolubles (*o*) et solubles (*x*) dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse par les bactéries de la putréfaction.

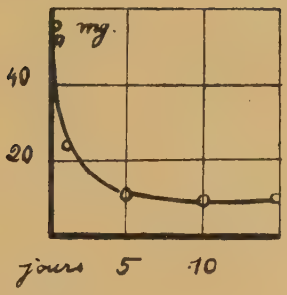


FIG. 24

Courbe représentative des variations du poids de phosphore lipidique fixé aux protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse par les bactéries de la putréfaction.

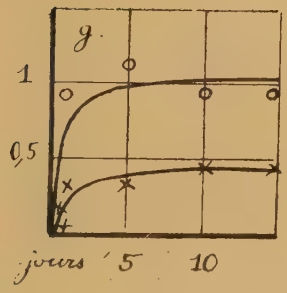


FIG. 25

Courbes représentatives des variations des poids de lipides (*o*) et de cholestérol (*x*) extraits par l'éther de 1.000 cm³ de sérum en fonction de la durée de l'hydrolyse par les bactéries de la putréfaction.

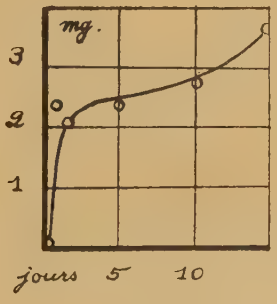


FIG. 26

Courbe représentative des variations du poids de phosphore lipidique extrait par l'éther de 1.000 cm³ de sérum en fonction de la durée de l'hydrolyse par les bactéries de la putréfaction.

Conclusions du Chapitre IV

Les enzymes secrétés par les bactéries de la putréfaction et les diastases de l'autolyse provoquent une hydrolyse partielle des protéides sériques.

Cette hydrolyse semble porter exclusivement sur les protéides libres et sur les cénapses les moins riches en lipides.

Contrairement à ce qui se passe avec la trypsine et la papaïne, la lipophanérèse apparaît et peut être aisément mise en évidence.

Chapitre V

Hydrolyse chimique des protéides du sérum sanguin

Au cours de notre étude historique sur l'hydrolyse des protéides, nous avons exposé les intéressants résultats auxquels a conduit cette étude.

L'hydrolyse acide, nous l'avons vu, a permis à Fischer de déterminer la composition en aminoacides de nombreux protéides.

Cette technique ne peut pas être utilisée dans l'étude de la lipophanérèse qui nous intéresse ici, car, au fur et à mesure de leur libération, les lipides seraient détruits.

L'hydrolyse alcaline ne présente pas tout à fait les mêmes inconvénients, car le cholestérol libéré possède la propriété de résister aux alcalis.

Nous avons donc étudié ici la cholestérophanérèse produite au cours de l'hydrolyse alcaline des protéides sériques. Mais avant d'aborder cette étude, il fallait être certain que, dans nos conditions d'expérience, le cholestérol résiste aux alcalis. C'est pourquoi nous avons commencé

par étudier l'action des alcalis à l'autoclave (à 110°) sur le cholestérol en effectuant l'expérience suivante :

On prépare sept tubes contenant 5 cm³ de sérum de Cheval et 1,2 cm³ de lessive de soude. Six d'entre eux sont placés à l'autoclave à 120° et retirés après un séjour d'une demi-heure (n° 2), une heure (n° 3), deux heures (n° 4), quatre heures (n° 5) et huit heures (n° 6). Le tube n° 1 sert de témoin.

Chaque échantillon est neutralisé (d'abord avec de l'acide chlorhydrique au cinquième, puis avec de l'acide chlorhydrique normal). Il est porté à l'ébullition pendant un quart d'heure après avoir été additionné de cinq fois son volume d'alcool.

Après centrifugation, le liquide alcoolique surnageant est recueilli, et le résidu est épuisé de nouveau deux fois consécutives avec de l'alcool. Il est ensuite traité à l'éther. Les solutions alcoolo-éthérées sont alors soumises à l'évaporation. Sur le résidu, on pratique le dosage du cholestérol, grâce à la réaction de Liebermann-Burchard (111-19) par comparaison avec un témoin.

Nos résultats ont été les suivants :

N° 1. — Témoin	4,2 mg.	de cholestérol.
N° 2. — 1/2 heure d'autoclave.	4,2 mg.	»
N° 3. — 1 heure » .	4,4 mg.	»
N° 4. — 2 heures » .	4,2 mg.	»
N° 5. — 4 heures » .	4,8 mg.	»
N° 6. — 8 heures » .	4,0 mg.	»

Ils montrent que, dans nos conditions expérimentales, le cholestérol résiste à l'action des alcalis.

Notre expérience sur la protéolyse chimique a été effectuée de la façon suivante :

9 ballons, numérotés de 1 à 9, contiennent 25 cm³ de sérum de Cheval et 6 cm³ de lessive de soude.

Le ballon n° 1 constitue le témoin, les huit autres sont portés à l'autoclave à 120° et retirés après un séjour de cinq minutes (n° 2), dix minutes (n° 3), vingt minutes (n° 4), trente minutes (n° 5), une heure (n° 6), deux heures (n° 7), quatre heures (n° 8), huit heures (n° 9).

Sur chaque échantillon, on effectue un dosage d'azote aminé, de protéides totaux, de lipides fixés aux protéides et de phosphore.

Des parties aliquotes de chaque échantillon sont neutralisées, puis agitées avec de l'éther. Sur l'extrait éthéré, on dose les substances extraites, le cholestérol et le phosphore.

Le tableau n° 6 indique les résultats que nous avons obtenus (ils sont ramenés à 1 litre de sérum).

Ces résultats montrent que l'hydrolyse effectuée par la soude est loin d'être complète, puisque 46 p. 100 seulement de l'azote sont libérés au cours de l'hydrolyse. Il reste donc des liaisons extrêmement stables que seule une hydrolyse en milieu acide concentré peut rompre.

Le poids de protéides diminue tout d'abord, mais à la longue il se produit une dénaturation qui explique les chiffres élevés que nous trouvons à la fin de l'opération.

La cholestérophanérèse est bien évidente : dès que 7 p. 100 de l'azote ont été libérés, la totalité du cholestérol s'est trouvée libre. Ce résultat nous paraît intéressant, car il montre la nette différence d'action entre les agents biologiques et chimiques.

Lorsque l'azote aminé libéré est d'environ 1 g. par litre, il n'y a pratiquement aucune cholestérophanérèse en cas d'hydrolyse enzymatique; au contraire, tout le cholestérol est libéré au cours de l'hydrolyse alcaline; il est vrai que cette dernière a été effectuée à l'autoclave à 120° et que, dans ces conditions, l'édifice protéidique subit très rapidement des modifications considérables.

TABLEAU VI

Nos	Durée de l'hydrolyse	Azote (1) aminé (g.)	Protéides totaux (g.)	Lipides totaux (g.)	Phosphore lipidique (mg.)	Cholestérol (g.)	Substances extraites par agitation avec de l'éther (g.)	Cholestérol extrait par agitation avec de l'éther (g.)	Phosphore lipidique extrait par agitation avec de l'éther (mg.)
1.....	0 (témoin)	0,6	76,0	3,69	4,17	1,08	0,52	0,038	»
2.....	5 minutes	1,1	»	»	»	»	3,37	0,794	2,88
3.....	10 minutes	1,5	»	»	»	»	4,26	0,993	2,31
4.....	20 minutes	2,6	»	»	»	»	4,03	1,01	1,73
5.....	30 minutes	3,2	4,56	3,23	23,6	»	4,48	0,85	traces
6.....	1 heure	4,2	8,48	2,55	16,7	»	5,00	0,90	traces
7.....	2 heures	4,5	15,89	3,17	7,6	»	4,52	0,94	traces
8.....	4 heures	5,2	29,14	3,56	11,0	»	3,68	0,78	0
9.....	8 heures	5,7	30,85	»	2,7	»	4,10	0,83	0

(1) Azote total : 12,25 g. par litre ; cholestérol : 1,08 g. par litre.

A ce tableau correspondent les courbes des figures 27, 28 et 29.

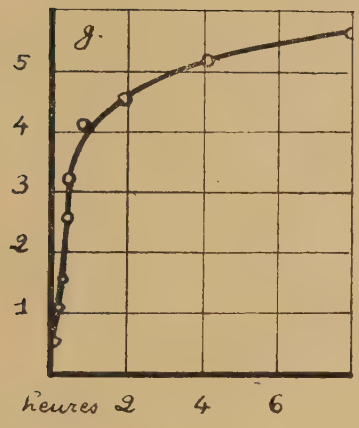


FIG. 27

Courbe représentative des variations du poids (en g. par litre) d'azote aminé en fonction de la durée de l'hydrolyse alcaline.

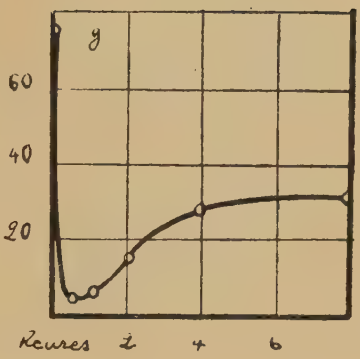


FIG. 28

Courbe représentative des variations du poids de protéides (de 1.000 cm³ de sérum) en fonction de la durée de l'hydrolyse alcaline.

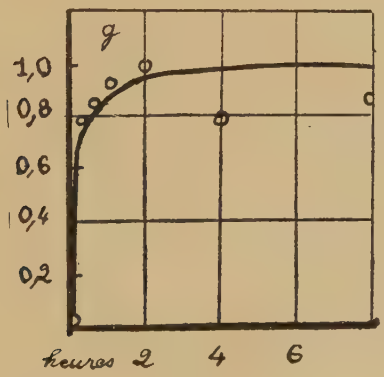


FIG. 29

Courbe représentative des variations du poids de cholestérol extrait par l'éther de 1.000 cm³ de sérum en fonction de la durée de l'hydrolyse alcaline.

Conclusions du Chapitre V

La lessive de soude au cinquième et à 120° permet d'obtenir une hydrolyse avancée des protéides sériques en une heure environ et ne permet pas d'obtenir l'hydrolyse totale comme les acides concentrés.

Lorsque 7 p. 100 environ de l'azote peptidique ont été libérés, le cholestérol se trouve détaché des protéides. Ceci montre la différence considérable qui existe entre la protéolyse enzymatique et la protéolyse chimique.

CONCLUSIONS

Après une brève étude sur le système lipidoprotéidique du sérum sanguin, nous avons exposé les difficultés que présente l'hydrolyse des protéides sériques en insistant particulièrement sur le rôle joué par les anti-enzymes.

En opérant dans certaines conditions que nous avons précisées dans notre travail, nous avons repris l'étude de la protéolyse sérique par voie enzymatique, puis par voie chimique. En même temps, nous avons étudié la lipophanérèse provoquée au cours de la lyse des protéides.

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent d'émettre les conclusions suivantes :

— La pepsine transforme très rapidement les protéides sériques en protéoses en hydrolysant un nombre assez restreint de liaisons peptidiques. Elle commence, tout d'abord, par s'attaquer aux protéides libres, puis aux cénapses lipidoprotéidiques les moins riches en lipides.

Malgré le très petit nombre de liaisons peptidiques hydrolysées, l'édifice protéidique subit d'importantes modifications, car une appréciable quantité de cholestérol se trouve libérée, tandis que les protéides eux-mêmes ont perdu très rapidement leur insolubilité dans les solutions salines (protéoses).

— La trypsine hydrolyse un grand nombre de liaisons peptidiques; les protéides sériques restent cependant beaucoup moins solubles dans les solutions salines qu'après action de la pepsine qui, nous l'avons vu, ne s'était attaquée qu'à un très petit nombre de liaisons amides. La trypsine, ici encore, attaque surtout les protéides libres.

Malgré le degré de protéolyse assez avancé, il ne se produit pas de lipophanérèse appréciable.

— La papaïne est susceptible, dans certaines conditions, de porter son action sur un certain nombre de liaisons amidées des protéides sériques.

Cette action, plus marquée que celle de la pepsine, est beaucoup moins importante que celle de la trypsine. Néanmoins, les protéides perdent très rapidement leur insolubilité dans les solutions salines. Comme dans le cas de la pepsine et de la trypsine, la papaïne s'attaque tout particulièrement aux protéides libres et semble respecter les cénapses lipidoprotéidiques. De même que pour la trypsine, aucune lipophanérèse n'apparaît au cours de l'hydrolyse des protéides sériques par la papaïne.

Une étude concernant l'action des bactéries de la putréfaction sur les protéides sériques nous a permis de souligner une fois de plus la résistance des cénapses lipidoprotéidiques à la protéolyse.

Enfin, nous avons terminé notre travail par une étude de la cholestérophanérèse provoquée par la protéolyse alcaline du sérum. Cette étude nous a permis de noter la dif-

férence primordiale qui existe entre la protéolyse enzymatique et la protéolyse chimique.

Malgré leur spécificité d'action, toutes les protéases que nous avons étudiées respectent les cénapses lipidoprotéidiques riches en lipides. Cette constatation nous permet d'émettre des conclusions d'ordre théorique et pratique.

Elle nous permet, en particulier, de reprendre les recherches effectuées jadis par Biedermann (14).

On sait que la simple présence de lipides mélangés à des protéides ne ralentit pas la digestion de ces derniers (Walter, 240). Donc, si la protéolyse enzymatique ne s'exerce pas sur les cénapses lipidoprotéidiques, c'est que, dans ces complexes, les lipides réellement fixés aux protéides jouent le rôle de protecteurs; c'est précisément la conception de Biedermann (14).

L'organisme n'aurait-il pas là un moyen de protéger de l'autolyse ses propres tissus ?

Dans une cellule animale morte, les complexes lipidoprotéidiques deviennent labiles (240) ; ceci expliquerait l'action immédiate des protéases sur les cellules mortes.

En faisant agir les enzymes protéolytiques sur le sérum, nous détruisons les protéides libres. Notre sérum se concentre donc en cénapses lipidoprotéidiques, qui deviennent de plus en plus riches en lipides. Or, pour certaines recherches, il est utile d'obtenir ces cénapses, dont l'extraction est parfois complexe (120), malgré les simplifications apportées à la méthode originelle (124-122).

Peut-être, allons-nous trouver ici un moyen de les obtenir plus facilement ?

En envisageant maintenant nos résultats, nous comprenons les difficultés rencontrées par les auteurs qui se sont attaqués à la protéolyse dans le sérum sanguin.

Si, en effet, il existe dans le sang des antienzymes qui

contrarient l'action des diastases, il y a également une gangue lipidique qui protège les protéides des protéases et qui nous explique la raison pour laquelle les enzymes autolytiques choisissent dans leur action les tissus morts et éliminent ainsi les déchets qui souillent notre organisme tout en respectant les tissus vivants.

Vu : *Le Doyen,*
DUPÉRIÉ.

Le Président du Jury,
CHELLE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER.

Bordeaux, le 17 Janvier 1946.

Le Recteur,
A. MARCHAUD.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abderhalden (E.). — Hydrolyse der Kristallisierten serumalbumins aus Pferd., *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1902, **37**, 495.
2. Abderhalden (E.) et Brochmann (H.). — Beitrag zur Konstitutionsermittlung von Proteinen bzw., *Polypeptiden. Biochem. Zeitschr.* 1930, **225**, 386.
3. Achard (C.) et Boutaric (A.). — Quelques recherches physico-chimiques sur les suspensions préparées à partir des protéines séparées du sérum par la méthode dite à l'acétone, *C. R. Ac. Sc.*, 1932, **195**, 1196.
4. Achard (C.), Grigaut (A.) et Codounis (A.). — Le rôle des lipides dans le dosage réfractométrique des protéines du sérum, *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 679.
5. Adair (G.-S.) et Robinson (M.-E.). — The analysis of the osmotic pressures of the serum proteins and the molecular weigts of albumins and globulins, *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 1864.
6. Astbury. — *Nature*, 1936, **137**, 803.
7. Astruc (A.). — *Traité de pharmacie galénique*, 2 vol., Maloine, édit., Paris, 1933.
8. Aszodi (Z.). — Ueber den Schwefelgehalt verschiedener Serum-globuline, *Biochem. Zeitschr.*, 1929, **212**, 102.
9. Bancroft (W.-D.) et Browning (H.-F.). — How to determine structural formuls for proteins, *Journ. Phys. Chem.*, 1937, **41**, 1163.

10. Banting (F.-G.) et Gairns (S.). — The antitryptic properties of blood serum, *Journ. Physiol.*, 1930, **94**, 241.

11. Beauverie (J.). — Sur la valeur des inclusions huileuses ou lipoïdes des plastes (leuco et chloro-plastes) et des mitochondries, *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 311.

12. Bergmann (M.) et Ross (W.-F.). — On proteolytic enzymes VIII, The proteolytic systems of papain, *Journ. of Biol. Chem.*, 1935, **111**, 659.

13. Bertrand (J.). — Thèse doctorat Univers. (pharmacie), Lille, 1938.

14. Biedermann (W.). — Ueber Wesen und Bedeutung der Protoplasma-lipoïde, *Pflüg. Archiv.*, 1924, **202**, 213.

15. Blankenstein (A.) et Fischer (A.). — Untersuchungen über die chemischen Konstitution der Serum und Gewebseiweibkörper, *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **224**, 211.

16. Boutaric (A.). — Propriétés physico-chimiques des protéines du sérum isolées par la méthode à l'acétone, *Protoplasma*, 1933, **18**, 286.

17. Boutaric (A.) et Roy (M.). — Etudes physico-chimiques des protéines, *Ann. Physiol. Physicö-Chim. Biol.*, 1936, **12**, 48.

18. Bruger (M.). — The state of cholesterol and the nature of the cholesterol protein complex in pathological body fluids, *Journ. of Biol. Chem.*, 1935, **108**, 463.

19. Burchard. — *Diss. Rostock*, 1889.

19bis. Burk (N.-F.). — Osmotic pressure, molecular weight and stability of serum-globulin, *Journ. of Biol. Chem.*, 1937, **121**, 373.

20. Butler (A.-M.) et Montgomery (H.). — The solubility of the plasma proteins. — I. Dependence ön salt and plasma concentrations in concentrated solutions of potassium phosphate, *Journ. of Biol. Chem.*, 1932, **99**, 173.

21. Campbell (W.-R.) et Hanna (M.-I.). — Determination of albumin-globulin ratios in human serum, *Trans. Roy. Soc. Can.*, 1931, V **25**, 29.

22. Cantacuzene (J.) et Jonelscu-Mihailsti (C.). — De l'action empéchante du sérum sur la digestion par la pepsine, *C. R. Soc. Biol.*, 1908, **65**, 273.

23. Caro (L. de) et Laporta (M.). — Sul variare delio tensione superficiale delle soluzioni proteiche in funzione del *p*H, *Arch. Sc. Biol.*, 1930, **14**, 1.

24. Chiaki Sako et Mangoro Inabe. — Furthur studieson the essential nature of antitryptic activity of sera, *Sei-i-kwai Med. J.*, 1929, **48** (n° 2), 90, d'après *Chem. Abstr.*, 1930, **24**, 5857.

25. Chick (H.). — *Biochem. Journ.*, 1914, **8**, 804.

26. Chrometzka (F.). — Antitrypsin III. Nature, *Z. Ges. Exptl. Med.*, 1932, **80**, 395, d'après *Chem. Abstr.*, 1933, **7**, 2698.

27. Chrometzka (F.) et Knocke (W.). — Antitrypsine. I. Determination in serum, *Z. Ges. Exptl. Med.*, 1930, **69**, 656, d'après *Chem. Abstr.*, 1931, **25**, 4014.

28. Ciaccio. — *Boll. Soc. di Biol. Sperim*, 1926, 144, **1**.

29. Cohn (E.-J.). — The physical chemistry of the proteins, *Physiol-Rev.*, 1925, **5**, 349.

30. Cornelli (W.). — Studies on the antitryptic factor in human blood serum, *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **242**, 61, d'après *Chem. Abstr.*, 1932, **26**, 1326.

31. Czapek (F.). — *Ber. Bot. Ges.*, 1919, **37**, 207.

32. Damodaran (M.) et Ananta-Narayanan (P.). — Enzymatic protéolysis. I. Liberation of ammonia from proteins, *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 1877.

33. Delezenne (C.), Mouton (H.) et Pozerski (E.). — Sur l'allure normale de quelques protéolyses par la papaïne, *C. R. Soc. Biol.*, 1906, **59**, 68.

34. Delezenne (C.), Mouton (H.) et Pozerski (E.). — Sur la digestion brusque de l'ovalbumine et du sérum sanguin par la papaïne, *C. R. Soc. Biol.*, 1906, **59**, 309.

35. Demenier (G.). — *Contribution à l'étude des protéines du sérum sanguin.* Thèse doctorat Univ. (pharmacie), Bordeaux, 1934.

36. Denis (P.). — *Mémoire sur le sang,* 1 vol., Baillière, édit., Paris, 1859.

37. Derrien (Y.), Roche (J.) et Mandel. — Sur le fractionnement des constituants protéiques du sérum, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 348.

38. Doerr et Berger. — *Biochem. Zeitschrift*, 1902, **131**, 13.

39. Dormeyer (C.). — Die quantitative Bestimmung von Fetten. Seifen und Fettsaüren in thierischer Organen, *Pflüg. Arch.*, 1896, **65**, 90.

40. Duboy (J.). — *Recherches sur la précipitation des albumines et des lipides du sérum sanguin par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.* Thèse de doctorat Université (pharmacie), Bordeaux, 1943.

41. Duclaux (J.). — Introduction à l'étude des protéines, *Traité de Chimie-Physique,* t. V, chap. I; Hermann, édit., Paris, 1936.

42. Dulière (W.-L.). — Les albumines et des globulines dans le sérum humain d'après différentes méthodes de précipitation, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 923.

43. Eagle (H.) et Harris (T.-N.). — Blood coagulation. V. The coagulation of blood by protéolytic enzymes (trypsin, papaïn), *Journ. Gen. Physiol.*, 1937, **20**, 543.

44. Effront (E.). — *Les catalyseurs bio-chimiques dans la vie et dans l'industrie,* 1 vol.; Dunod et Pinat, édit., Paris, 1914.

45. Erlandsen (A.). — Untersuchungen über die lecithinartigen Substanzen des Myocardiums und der quergestreiften Muskeln, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1907, **51**, 71.

46. Ettisch (G.) et Sachsse (H.). — Zur Frage der chemischen Selbsstândigkeit der Serum proteine, *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **230**, 129.

47. Euler (H. von), Karrer (P.) et Zehender (F.). — Das Verhalten von Vitamin C (Ascorbinsaüre) und anderer Reduktone gegen katheptische und andere Enzyme, *Helv. Chem. Act.*, 1934, **17**, 157.

48. Fabre (R.) et Frossard (R.). — Influence de la réaction du milieu sur la digestion papaïnique, *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, 59.

49. Faure-Fremiet (E.). — Etude sur les mitochondries des protozoaires et des cellules sexuelles, *Arch. Anat. Microsc.*, 1910, **11**, 457.

50. Fermi et Pernossi (d'après Fermi). — *Arch. de Farmacol. Sperim.*, 1909, **8**, 407.

51. Firdmann (J.). — L'optimum thermique de l'action des enzymes en fonction de leur origine et de leur degré de pureté, *Ann. d. Physiol.*, 1938, **14**, 67.

52. Fischer (A.) et Blankenstein (A.). — Untersuchungen über die chemische Konstitution des Serum und Organeiweisskörper. III et IV. *Biochem. Zeitschrift*, 1930, **228**, 437 et 1931, **231**, 404.

53. Fleury (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1925, **7**, 536.

54. Forremann-Harris. — *Biochem. Journ.*, 1935, **24**, 2820.

55. Freund (E.) et Joachim (J.). — Zur Kenntnis der Serum globulin, *Zeitschrift. Physiol. Chem.*, 1902, **36**, 407.

56. Freund (E.) et Lustig (B.). — Ueber den Chemismus der Eiweiss-coagulation, *Biochem. Zeitschr.*, 1926, **167**, 355.

57. Froidevaux. — *C. R. Ac. Sc.*, 1923, **177**, 1043.

58. Fuld (E.) et Spiro (K.). — Ueber die labende und labhammende wirkung des Blutes, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1900, **31**, 132.

59. Furth (O.) et Fischer (A.). — Ueber die Ermittlung des Tyrosingehalts von Proteinen, *Biochem. Zeitschr.*, 1924, **154**, 1.

60. Giedroye (W.), Janiki (J.), Cichocka (J.). — Tryptic digestion of albumin derived from different sources, *Enzymologia,* 1938, **5**, 81, d'après *Chem. Abstr.*, 1938, **32**, 9117.

61. Girauld (A.) et Rubinstein (M.). — *C. R. Soc. Biol.,* 1912, **73**, 205.

62. Glaesner. — *Beit. z. Chem. Physiol. u. Path.*, 1903, 79.

63. Goiffon (R.) et Haudiquet (R.). — Dégagement de corps sulfurés en quantités définies par l'hydrolyse alcaline des albumines sur mesure colorimétrique par les réactions phosphotungstiques, *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1625.

64. Goldschmidt (O.) et Kahn (H.). — Die Fraktiönnierung der wasserlöslichen Eiweisskörper des Blutserums, *Zeitschrift f. Physiol. Chem.*, 1929, **183**, 19.

65. Goris (A.) et Liot (J.). — *Pharmacie galénique,* 2e éd., 2 vol., Masson, édit., Paris, 1943.

66. Gorter (E.) et Blokfer (P.-C.). — Détermination de l'albumine et de la globuline du sérum par la méthode d'étalement, *Proc. Amsterdam,* 1942, **45**, 151; d'après *Bull. Soc. Ch. de France,* 1943, 56.

67. Grabar (P.). — Ultrafiltration fractionnée des protéines du sérum sanguin, *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 72.

68. Grassmann (W.), Dyckerhoff (H.) et Schoenebeck (O. von). — Ueber naturliche Aktivatoren und Hemmungskörper proteolytischer Enzyme, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1930, **186**, 183.

69. Grönwall (A.). — Chloroform als Fâllungsmittel für serum eiweib, *Biochem. Zeitschr.*, 1935, **282**, 85.

70. Guido Finzi. — *C. R. Soc. Biol.*, 1909, **67**, 1007.

71. Haas et Trautmann. — *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1923, **127**, 52.

72. Halliburton. — *Journal of Physiol.*, 1886, **7**, 319.

73. Hamburger (W.). — Chemo-biological Study of the relatiöns of pepsin to so-called anti-pepsin, *Journ. öf Exp. Med.*, 1911, **14**, 535.

74. Hammarsten (E.). — *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1884, 8, 467.

75. Hammarsten (E.). — Ueber die Eiweisstoffe des Blutserums, *Erg. der Physiol.*, 1903, 1, 330.

76. Handowski et Wagner. — *Biochem. Zeitschr.*, 1911, 31, 33.

77. Hardy (W.-B.). — Colloïdal solution. The globulins, *Journ. of Physiol.*, 1905, 33, 251.

78. Hartley. — *Brit. Journ. of Exp. Pathol.*, 1915, 6, 180.

79. Haslam. — *Biochem. Journ.*, 1913, 7, 492.

80. Herzfeld (E.). — *Schweiz. Med. Wochschrift*, 1922, 52, 411.

81. Hewitt (L.-F.). — Chemistry of antibodies and serum proteins. — I. Nitrogen distribution and aminoacids. — II. Protein carbohydrate groups, *Biochem. Journ.*, 1934, 28, 2080.

82. Hewitt (L.-F.). — Preparation and properties of a globulin present in the albumin fraction of serum, *Biochem. Journ.*, 1938, 32, 26.

83. Hofmeister (F.). — Ueber die durch phosphorwolframsaüre fâllbaren Substanzen der Harns, *Zeitschrift f. Physiol. Chem.*, 1881, 5, 67.

84. Hofmeister (F.). — Zur Lehre von der Wirkung der Salz. Dritte Mittheilung, *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 1889, 25, 1.

85. Hofmeister (F.). — Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Fünfte Mittheilung. Untersuchungen über den Quellungsvorgang, *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 1889, 27, 395.

86. Homer (A.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1889, 278.

87. Hoppe-Seyler (F.). — *Medizinische Chemische Untersuch. a. D. Labor. f. angew. Chem. Tübingen*, 1867-1871, 2; 215, 3; 391 et 4, 486.

88. Howe. — The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood, *Journ. of Biol. Chem.*, 1921, 49, 93.

89. Hussey et Northrop. — *J. Ges. Physiol.*, 1923, **5**, 335.

90. Jacoby (M.). — Zur Kenntnis der Fermente und Antifermente, *Biochem. Zeitschr.*, 1906, 114.

91. Jameson (E.) et Roberts (D.-B.). — A Phase rule study of the proteins of the blood serum : a comparison of the proteins of human, rat and horse serum, *Journ. Gen. Physiol.*, 1937, **20**, 475.

92. Javal et Bovet. — Transformations physico-chimiques produites par la putréfaction dans le sérum sanguin, *C. R. Soc. Biol.*, 1910, **69**, 489.

93. Javillier (M.). — *Des ferments protéolytiques.* Thèse agrégation de pharmacie, Paris, 1909.

94. Jowett (M.) et Quastel (J.). — *Bio. Chem. Journ.*, 1933, **27**, 486.

95. Kalcheva (D.). — Precipitation of the protein of blood serum by cooper sulfate, *Ann. Univ. Sofia*, II, Faculté Phys. Math.; 1934, **30**, n° 2, 61; d'après *Chem. Abstr.*, 1935, **29**, 3360.

96. Kauder (G.). — Zur Kenntnis der Eiweisskörper des Blutserums, *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 1886, **20**, 411.

97. Kijotari (U.). — Ueber den Tryptophan und Tyrosingehalt des Hâmoglobins und anderer Blutprotein, *Biochem. Zeitschr.*, 1923, **134**, 322.

98. Kingsley (G.-R.). — A rapid method for the separation of serum albumin and globulin, *Journ. of Biol. Chem.*, 1940, **133**, 731.

99. Kleinmann (H.) et Charr (G.). — Studies on animal tissue proteases. IX. Protéolytic enzymes of serum of different animals, *Biochem. Zeitschr.*, 1932, **251**, 275, d'après *Chem. Abstr.*, 1932, **26**, 5586.

100. Krebs (H.-A.). — Studies on the proteolytic action of papaïne, *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **220**, 289; d'après *Chem. Abstr.*, 1930, **24**, 3804.

101. Krebs (H.-A.). — Ueber die Proteolyse der Tumoren, *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **239**, 174.

102. Krebs (H.-A.). — The proteolytic action of papaïn and cathepsin, *Naturwissenschaften*, 1931, **19**, 133; d'après *Chem. Abstr.*, 1931, **25**, 1848.

103. Kuhne. — *Lehrb. d. Physiol. Chem. Leipzig*, 1886, p. 175.

104. Kumagawa et Suto. — *Biochem. Zeitschr.*, 1908, **8**, 213, 250, 340, 347.

105. Lambling (E.). — Le sang et la respiration. *In Encyclopédie Chimique*, 1 vol., Flammarion, édit.; Paris, 1895.

106. Launoy (L.). — Pouvoir antitryptique du sérum, méthode de mesure de ses valeurs limites, leur expression numérique, *C. R. Soc. Biol.*, 1918, **81**, 416.

107. Launoy (L.). — Principes d'une technique pour suivre la marche de la protéolyse dans un milieu gélatine trypsine, *C. R. Soc. Biol.*, 1918, **81**, 742.

108. Leipert (T.) et Hafner (I.). — The cleavage of tyrosine and tryptophan from casein by papaïn activited by hydrocyanic acid, *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **229**, 427, d'après *Chem. Abstr.*, 1931, **25**, 1545.

109. Lepeschkin (W.-W.). — Ueber die chemische Zusammensetzung der lebenden Materie, *Biochem. Zeitschr.*, 1926, **171**, 126.

110. Lewith (S.). — Zur Lehre von der Wirkung der Salze, *Arch. f. Exp. Path.*, 1888, **24**, 1.

111. Liebermann (L.). — *Ber. d. d. Chem. Ges.*, 1885, **18 S**, 1804.

112. Liebermann (L.). — Notiz über das chemische Verhalten des Nierenparenchyms, *Pflüg. Arch.*, 1891, **50**, 55.

113. Linderström-Lang (K.) et Schmidt. — *C. R. Lab. Carlsberg*, 1930, **18**, n° 3, 1.

114. Linossier (G.). — Sur l'antipepsine du sérum, *C. R. Soc. Biol.*, 1918, **81**, 422.

115. Lunde (G.) et Wulbert (K.). — Ueber die Fâallung von Eiweisskörper mit Eisenhydroxydsol, *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **219**, 171.

116. Lundin (H.) et Schröderheim (J.). — Ueber die Fâllung von Eiweisstoffen und ihrer Spaltungsprodukte mit Tannin, *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **238**, 1.

117. Mac Farlane (A.-S.). — The ultracentrifugal analysis of normal and pathological serum fraction, *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1209.

118. Machebœuf (M.). — Méthode permettant le dosage exact du phosphore dans de petites quantités de sang, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, **8**, 464.

119. Machebœuf (M.). — Méthode de microdosage des proportions de phosphore contenues dans les divers constituants du sang normal, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 94.

120. Machebœuf (M.). — *Recherches sur les stérols, les lipides et les protéides du sérum et du plasma sanguins.* Thèse doctorat ès sciences, Paris, 1928.

121. Machebœuf (M.). — *Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique*, 1 vol.; Hermann, édit., Paris, 1937.

122. Machebœuf (M.) et Dizerbo (L.). — Méthode simplifiée d'obtention des cénapses acidoprécipitables, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 268.

123. Machebœuf (M.) et Dubois (J.). — Etude de la précipitation des albumines du sérum sanguin et des lipides qui les accompagnent par le sulfate d'ammonium en fonction du *p*H, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 272.

124. Machebœuf (M.) et Januskiewicz (M.). — Recherches sur les cénapses lipidoprotéidiques du sérum sanguin : nature des protéides entrant dans la constitution de ces cénapses, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 694.

125. Machebœuf (M.) et Sandor (G.). — Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther en présence d'alcool, *C. R. Ac. Sc.*, 1932, **194**, 1102.

126. Machebœuf (M.) et Sandor (G.). — Recherches sur la nature et la stabilité des complexes protéides-lipides. Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther en présence d'alcool, *Bull. Soc. Chim.*

Biol., 1932, **14**, 1168 et *Arch. Intern. Physiol. et Physico-Ch. Biol.*, 1932, et *Congrès Int. Physiol. Rome*, 1932, 163.

127. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Sur l'état des lipides et du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction de certaines cénapses lipidoprotéidiques et libération de leurs substances lipoïdiques par un savon, *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **206**, 860.

128. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Libération des lipides de certaines cénapses lipidoprotéidiques du sérum sanguin par divers savons, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1181.

129. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Méthode permettant de délipider, sans les dénaturer, les globulines du sérum sanguin. Application à l'étude du rôle des lipides dans le fractionnement des globulines en euglobulines et pseudoglobulines, *C. R. Soc. Biol.*, 1938; **129**, 1184.

130. Machebœuf (M.), Tayeau (F.) et Battut (V.-M.). — Comparaison des diverses techniques de séparation et de dosage des globulines et de leurs fractions dans le sérum sanguin. Considérations sur la définition des termes « globulines », « euglobulines » et « pseudoglobulines », *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 481.

131. Machebœuf (M.) et Viscontini (M.). — Combinaisons entre protéides et cuivre, *C. R. Ac. Sc.*, 1943, **217**, 305.

132. Maillard (L.-C.). — Sur le virage de la phtaléine dans la méthode du dosage des acides aminés au formol, *C. R. Soc. Biol.*, 1914, **73**, 809.

133. Malerba. — *Acad. de Scienze Fisiche et Med. d. Napoli*, fasc. 3, 5, 1894.

134. Marcus (E.). — Ueber in Wasser lösliches Serumglobulin, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1899, **28**, 559.

135. Marcus (E.). — *Berl. Klin. Woch.*, 1908, **14**, 689.

136. Martin (M.). — *Recherches sur le fractionnement des protéides sériques.* Thèse doctorat Université (pharmacie), Bordeaux, 1944.

137. Maschmann (E.). — Beitrâge zur Aktivierung pflanzlicher Proteinasen, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1934, **228**, 141.

138. Maschmann (E.) et Helmert (E.). — The activation of papaïne by vitamin C-iron and its inhibition by vitamin C (ascorbic acid), *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1934, **223**, 127, d'après *Chem. Abstr.*, 1934, **28**, 3085.

139. Maschmann (E.) et Helmert (E.). — Intracellular protéinases. XIV. Activation and inhibition of papaïne by potassium ferricyanide, *Biochem. Zeitschr.*, 1939, **279**, 213; d'après *Chem. Abstr.*, 1935, **29**, 8022.

140. Mellanby (J.) et Pratt (C.-L.-G.). — Coagulation of plasma by trypsin, *Proc. Roy. Soc.* (London), 1938, **B 125**, 204.

141. Metzger. — *Recherches sur la constitution des protéides du sérum à l'état normal et pathologique.* Thèse médecine, Strasbourg, 1932.

142. Meyer (K.). — Trypsin u. Antitrypsin, *Biochem. Zeitschr.*, 1909, **23**, 68.

143. Michailow. — *Maly's Jahresb*, 1884, **14**, 7.

144. Miescher (F.). — *Mediz. Gem. Untersuch. a. d. Labor. f. Angew. Chem. zu Tübingen*, 1871, **4**, 441.

145. Modern (F.) et Ruff (G.). — Etude physico-chimique de la désintégration protéolytique du sérum antidiphtérique, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 851.

146. Moerner (K.-A.-H.). — Zur Kenntnis der Bildung des Schwefels in den Proteinstoffen, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1902, **34**, 207.

147. Montani (L.-G.). — The determination of trypsin in the blood serum. Diagnostica tec. lab. (Napoli), *Riv. mensile*, 1932, **3**, 22, d'après *Chem. Abst.*, 1933, **27**; 1022.

148. Morgenroth. — *Berl. Klin. Woch.*, 1909, **16**, 758.

149. Mutzenbecher (P. von). — Die Analyse des Serums mit der Ultracentrifuge. Die Fraktionen des Serums, *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **266**, 226.

150. Mutzenbecher (P. von). — Die Fraktionen des Serums, *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **266**, 250.

151. Neber (M.). — Ueber die oxydative Desaminierung von Aminosaüren, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1936, **240**, 59.

152. Oguro (V.). — Ueber eine Methode zum quantitativen Nachweis des Antipepsins im serum, *Biochem. Zeitschr.*, 1909, **22**, 266.

153. Okabe. — *Journ. of Biochem.*, 1928, **8**, 459.

154. Oppenheimer. — *Verh. d. Berl. Physiol. Ges.*, 1902.

155. Panum. — *Wirchow. Archiv.*, 1851, **3**, 251.

156. Parat. — *Arch. Anat. microsc.*, 1929, **24**, 73.

157. Pérez (J.-J.). — *Contribution à l'étude de la solubilité des protéides.* Thèse doctorat ès sciences, Paris, 1939.

158. Piettre (M.). — Cité d'après Lematte (370) et *C. R. Ac. Sc.*, 1928, **186**, 1657.

159. Piettre (M.). — *Biochimie des protéines. Des protéines humorales au protoplasma par la méthode à l'acétone aux basses températures*, 1 vol., Baillière, édit., Paris, 1937.

160. Piettre (M.) et Vila (A.). — Séparation des protéines du sérum, *C. R. Ac. Sc.*, 1920, **170**, 1466 et *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921, **3**, 483.

161. Pinkus. — *Journ. of Physiol.*, 1901, **27**, 57.

162. Pirosky (I.) et Modern (F.). — Action des lécithines sur le fractionnement des sérums antitoxiques et transformation de la pseudoglobuline en euglobuline, *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 387.

163. Pochon (J.). — Recherches sur le pouvoir inhibiteur du sérum équin normal vis-à-vis de la papaïne, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 211.

164. Pohl (J.). — Ein neues Verfahren zur Bestimmung des globulins in Harn und in serösen Flüssigkeiten, *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 1886, **20**, 246.

165. Polimanti (O.). — Physikalisch-Chemische Veränderungen einiger normalen Flüssigkeiten wâhrend ihres Faulnissprozesses, *Biochem. Zeitschr.*, 1908, **11**, 280.

166. Polonovski (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 583; **120**, 28 et **121**, 1103.

167. Polonovski (M.). — *X^e Congrès Intern. Chimie Rome*, 1939, **5**, 163.

168. Polonovski (M.) et Lespagnol (A.). — *Chimie organique biologique*, 1 vol., 2^e éd.; Masson, édit.; Paris, 1941.

169. Porges et Spiro. — *Beitr. z. Chem. Physiol. u. Path.*, 1903, **3**, 277.

170. Pringsheim (H.), Borchardt (H.) et Hupfer (H.). — Ueber Glutathion als Aktivatör der fermentation Stârkeverzuckerung, *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **238**, 477.

171. Przylecki (S.-J.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1936, **114**, 95.

172. Purr (A.). — The influence of vitamin C (ascorbic acid) on plant and animal amylases, *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 1141.

173. Quinnan. — *Beitr. z. Chem. Physiol. u. Path.*, 1904, **5**, 95.

174. Ramon (G.). — *C. R. Ac. Sc.* (séance du 6 décembre 1943).

175. Ramon y Cajal. — *Tav. des Lab. de Invest .Biol.*, 1919, **37**, 207.

176. Reiss (P.). — *L'action du potentiel d'oxydation-réduction du milieu sur l'activité de différentes protéinases : hydrolyse et condensation.* Thèse doctorat ès sciences, Strasbourg, 1942.

177. Renaud. — Voir Astruc (7), p. 1267.

177^bis. Risley (E.-A.), Buffington (A.-C.) et Arnow (L.-E.). — Tryptic digestion of bovine serum and olber proteins in the presence of ethyl alcohol, *Journ. of. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 398.

178. Roche (A.). — Microdosage des albumines et des globulines du sérum, *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1022.

179. Roche (A.) et Bracco (J.). — Contribution à l'étude du poids moléculaire des globulines du sérum sanguin, *C. R. Ac. Sc.*, 1934, **199**, 98.

180. Roche (A.) et Bracco (J.). — Pression osmotique et poids moléculaire des globulines du sérum, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, **16**, 1479.

181. Roche (A.), Dorier (M.) et Marquet (F.). — Le poids moléculaire de la sérum albumine d'homme, *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 1150.

182. Roche (A.), Dorier (M.) et Samuel (L.). — Précipitation des protéines du sérum humain normal par le sulfate d'ammonium, *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1019.

183. Roche (A.) et Marquet (F.). — Sur la pression osmotique et le poids moléculaire de l'albumine du sérum, *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 898.

184. Roche (A.), Samuel (L.) et Arthaud (R.). — La précipitation des protéines du sérum par le sulfate d'ammonium et la signification des fractions précipitées à des concentrations variées, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 1061.

185. Roche (J.) et Martin-Poggi (R.). — Recherches sur l'ossification, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, **23**, 1534.

186. Rollet. — Blut und Blutbewegung in Hermann's, *Handbuch d. Physiol.*, 1880, **4**, 90.

187. Rondoni (P.). — The influence of phosphatides on proteolytic enzymes, *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1932, **207**, 103, d'après *Chem. Abstr.*, 1932, **26**, 3526.

188. Rubinstein (M.). — Procédé à la gélatine pour la recherche des substances antipeptiques du sérum, *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **72**, 23.

189. Rubinstein (M.). — Recherches sur les propriétés antipeptiques du sérum sanguin, *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **72**, 365.

190. Rubinstein (M.). — Sur l'antipepsine des sérums, *C. R. Soc. Biol.*, 1918, **81**, 511.

191. Salaskin (A.) et Solowjew (L.). — Ueber Beeinflussung der Arginase durch Sauerstoff, Kohlensaure und Zystein, *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1931, **199**, 259.

192. Samuely. — *Oppenheimer Handb. d. Bioch.*, 1904, **1**, 286.

193. Sandor (G.). — *Le problème des protéides.* Thèse de doctorat ès sciences, Paris, 1934.

194. Sandor (G.). — Point isoionique des protéides du sérum I. Méthode de détermination. Résultats obtenus, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 877.

195. Sandor (G.), Bonnefoi (A.) et Goret (P.). — Précipitation des albumines et des lipides du sérum sanguin par les sels neutres en fonction du *p*H, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, **15**, 1472.

196. Sandor (G.), Bonnefoi (A.) et Pérez (J.-J.). — Précipitation des protéides par les sels neutres, *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **197**, 1254.

197. Sawano (E.). — Contributions to the knowledge on the digestive enzymes in marine invertebrates. I. Proteolytic enzymes in Polypus vulgaris Lamarck, *Sc. Rep. Tokyo Bunr. Daig.*, 1935, **2**, 101.

198. Schaeffer (Y.). — Action de la trypsine. Mesure des variations de *p*H au cours de la digestion trypsique et influence de la réaction du milieu sur le processus, *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 581.

199. Schiff (H.). — *Ann. der Chemie,* 1899, **310**, 25; 1901, **319**, 59 et 1902, **325**, 348.

200. Schmidt (V.). — Weiteres über den Faserstoff und die Ursachen semer Gerunnung, *Arch. f. Anat. u. Physiol.*, 1862, **48**, 428.

201. Schnappauf. — Beitrâge zur Physiologie des Pepsins, *Diss.*, Rostock, 1888.

202. Schultz (F.-N.). — Die Bindungsweise des Schwefels in Eiweiss, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1898, **25**, 16.

203. Servantie (L.) et Demenier (G.). — Le microdosage des protéines du sang par la méthode à l'acétone suivie de Nesslérisation, *Bull. Biol. Pharm.*, 1934, 117.

204. Slive (A.). — Studies on antipepsin with a new quantitative method for its determination, *Journ. Labo. Clin. Med.*, 1933, **18**, 801.

205. Soerensen (S.P.L.). — *C. R. Lab. Carlsberg*, 1907, **7**, nombreux articles.

206. Soerensen (S.-P.-L.). — The solubility of proteins, *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1925, **47**, 457.

207. Soerensen (S.-P.L.). — *Kolloïd. Zeitschr.*, 1930, **53**, 306.

208. Soerensen (S.-P.-L.). — *C. R. Lab. Carlsberg*, 1930, **18**, 124.

209. Soerensen (S.-.P.-L.). — The constitution of soluble protein substances as reversible, dissociable component systems, *Kolloïd Zeitschr.*, 1930, **53**, 102; d'après *Chem. Abstr.*, 1931, 1931, **25**, 245.

210. Soerensen (S.-P.-L.) et Soerensen (M.). — Studies on proteins on the coagulation of proteins by heating, *C. R. Lab. Carlsberg*, 1923, **15**, 1.

211. Stern (K.-G.). — Autolytic action of animal tissue protéinases and the influence of heavy metals on them, *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **234**, 116; d'après *Chem. Abst.*, 1931, **25**, 4016.

212. Svedberg (T.) et Sjoegren (B.). — The *p*H stability regions of serum albumin and of serum globulin, *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1930, **52**, 2855.

213. Szymonovicz (P.). — *Lehrbuch der Histologie und der microskopischen Anatomie*, Leipzig, 1924.

214. Tayeau (F.). — *Recherches sur la nature, la stabilité et le rôle biologique des liaisons unissant les lipides et les protéides dans le sérum sanguin.* Thèse de doctorat ès sciences, Bordeaux, 1939.

215. Tayeau (F.). — Comparaison de l'action des divers savons sur le sérum sanguin en présence d'éther, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1027.

216. Tayeau (F.). — Recherches sur le vieillissement du sérum sanguin. Stabilité des lipides sériques en fonction de la conservation aseptique du sérum, *C. R. Soc. Biol.*, 1939.

217. Tayeau (F.). — Sur l'état du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction des cénapses cholestéro-protéidiques par les saponosides, *C. R. Ac. Sc.*, 1941, **212**, 575.

218. Tayeau (F.). — Destruction des cénapses cholestéro-protéidiques du sérum sanguin par les sels biliaires, *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 240.

219. Tayeau (F.). — Le système lipidoprotéidique du sérum sanguin chez les malades atteints d'ictère par rétention, *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 240.

220. Tayeau (F.). — Nouvelle méthode permettant l'extraction du cholestérol sanguin en vue de son dosage, *Bull. des travaux de la Soc. de Pharm. de Bordeaux*, 1943, **81**, 63.

221. Tayeau (F.). — Technique simple et rapide permettant le dosage du cholestérol dans le sérum sanguin, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 63.

222. Tayeau (F.). — *Protéides et lipides dans le sérum sanguin.* Thèse doctorat en méd., Bordeaux, 1944.

223. Tayeau (F.). — Nouvelles recherches sur la nature des liaisons unissant les lipides et les protéides dans le sérum sanguin. Action des saponosides en présence d'éther sur le sérum sanguin, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 287.

224. Tayeau (F.). — Etude sur les euglobulines du sérum sanguin, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 293.

225. Tayeau (F.). — Sur la nature des liaisons unissant les lipides et les protéides dans les cénapses acido-précipitables du sérum sanguin, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 700.

226. Tayeau (F.) et Martin (M.). — Sur la séparation des diverses fractions protéidiques du sérum sanguin, *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 503.

227. Tayeau (F.) et Martin (M.). — Sur la séparation des globulines et des albumines sériques par le sulfate d'ammonium, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 923.

228. Teff (C.). — The precipitation of proteids by alcoohol and certain other reagents, *Journ. of Physiol.*, 1905, **30**, 25.

229. Terroine (E.) et Lauresco (C.). — La libération de l'ammoniac au cours des protéolyses enzymatiques, *Arch. Intern. Physiol.*, 1935, **42**, 205.

230. Theorell (A.-H.) et Widström (G.). — Lipoïd analysis in blood with special reference to the total cholestérol, *Zeitschr. Ges. Exptl. Med.*, 1931, **75**, 699; d'après *Chem. Abstr.*, 1932, **26**, 2206.

231. Thiodet (J.) et Ribère (M.). — Nécessité d'une « normalisation » des définitions et des méthodes pour le dosage des protéines du sérum sanguin, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 495.

232. Thomas (P.). — *Manuel de biochimie*, 1 vol., Masson, édit., Paris, 1936.

233. Tiselius (A.). — Electrophoresis of serum globulin, *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 313.

234. Tiselius (A.). — Electrophoresis of serum globulin. II. Electrophoretic analysis of normal and immune serum, *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 1464.

235. Troensegaard et Koudahl. — *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1926, **153**, 93 et 111.

236. Vanaud (H.). — *Recherches sur les cénapses lipidoprotéidiques du sérum sanguin.* Thèse doct. Univ. (pharmacie), Bordeaux, 1942.

237. Van Slyke. — *Journ. of Biol. Chem.*, **12**, 275.

238. Wagner-Jauregg (T.) et Moller (C.). — *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1935, **236**, 222.

239. Waldschmidt-Leitz (E.) et Deutsch (W.). — Ueber die proteolytischen Enzyme der Milz. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1927, **167**, 285.

240. Walther (H.). — Ein Beitrag zur Frage der chemischen

Konstitution des Protoplasmas, *Biochem. Zeitschr.*, 1921, **122**, 86.

241. Weinberg (M.) et Rubinstein (M.). — Recherches sur le pouvoir antitrypsique du sérum, *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **72**, 718.

242. Went (I.-S.) et Farago (F.). — Der Einflud des Lecithins auf die Stabilitât der Serum-Eiweisskörper, *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **230**, 238.

243. Went (I.-S.) et Goreczky (L.). — Die Verteilung des Serum-phosphatide und des Cholesterins in durch Filtration durch grobporige Kolloïdiumfilter gewonnenen Serum-ultrafiltraten, *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **239**, 441.

244. Weyl (T.). — Beitrâge zur Kenntnis thierischer und pflanzlischer Eiweisskörper, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1877, **1**, 72.

245. Willstaetter (R.), Grassmann (W.) et Ambros (O.). — Blausaüre Aktivierung und Hemmung pflanzlischer Proteasen, *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1926, **151**, 286.

246. Willstaetter (R.) et Rohdewald (M.). — Ueber den Zustand des Glykogens in den Leber, im Muskel und in Leukocyten, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1934, **225**, 103.

247. Wrinch (C.-M.). — *Nature*, 1936, **137**, 411 et **138**, 651; 1937, **139**, 972 et 1938, **142**, 581.

248. Wunderly (C.). — Nephelometric microdetermination of the antitryptic titer, *Mikrochemie*, 1936, **21**, 88; d'après *Chem. Abstr.*, 1937, **31**, 724.

249. Ying-Lai-Wang. — Influence of toluene on the activity of pepsin and trypsin, *Journ. Chinese Chem. Soc.*, 1934, **2**, 340.

250. Young (E.-G.). — On the optical power of crystallin ovalbumin and serum albumin, *Proc. of Royal Soc. London*, 1922, **SB 93**, 15.

251. Zunz (E.). — Pouvoir antipepsique du sérum sanguin, *Ann. Acad. Belgique*, 1905.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 11

PREMIERE PARTIE

ETUDE HISTORIQUE

CHAPITRE I. — *Les protéides du sérum sanguin* 15

CHAPITRE II. — *Etat des protéides et des lipides dans le sérum sanguin. Théories sur le mode d'union entre protéides et lipides* 21

CHAPITRE III. — *La protéolyse* 27

Protéolyse chimique 28

Protéolyse au cours de la putréfaction.. 28

Protéolyse enzymatique 29

— Pepsine et antipepsine 29

— Trypsine et antitrypsine 31

— Papaïne et antipapaïne 33

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES UTILISEES

Dosage des aminoacides 35

Obtention des fractions protéidiques du sérum 36

Dosage des protéides et des lipides 38

Dosage du phosphore lipidique 39

Dosage du cholestérol 41

Dosage de l'azote total 42

Hydrolyses enzymatiques 42

TROISIEME PARTIE

RECHERCHES EXPERIMENTALES

CHAPITRE I. — *Action de la pepsine sur les protéides du sérum sanguin* 43

CHAPITRE II. — *Action de la trypsine sur les protéides du sérum sanguin* 51

CHAPITRE III. — *Action de la papaïne sur les protéides du sérum sanguin* 59

CHAPITRE IV. — *Action des bactéries de la putréfaction sur les protéides du sérum sanguin* 67

CHAPITRE V. — *Hydrolyse chimique des protéides du sérum sanguin* 73

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 79

BIBLIOGRAPHIE 83

Imprimerie René SAMIE, 31, 33, rue Teulère, Bordeaux — 31.0193